

Die zytostatische und zytotoxische
Wirkung von Azathioprin
und seinen Imidazol-Metaboliten
auf Lymphoblastenkulturen

Ursula Hantke



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0038

Aus der Medizinischen Klinik III der
Ludwig-Maximilians-Universität München
im Klinikum Großhadern

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Wilmanns

Die zytostatische und zytotoxische Wirkung von
Azathioprin und seinen Imidazol-Metaboliten auf
Lymphoblastenkulturen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ursula Hantke
aus
Grafenau
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Sauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns
Prof. Dr. W. Forth

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.87

1. ...
 2. ...
 3. ...
 4. ...
 5. ...
 6. ...
 7. ...
 8. ...
 9. ...
 10. ...
 11. ...
 12. ...
 13. ...
 14. ...
 15. ...
 16. ...
 17. ...
 18. ...
 19. ...
 20. ...
 21. ...
 22. ...
 23. ...
 24. ...
 25. ...
 26. ...
 27. ...
 28. ...
 29. ...
 30. ...
 31. ...
 32. ...
 33. ...
 34. ...
 35. ...
 36. ...
 37. ...
 38. ...
 39. ...
 40. ...
 41. ...
 42. ...
 43. ...
 44. ...
 45. ...
 46. ...
 47. ...
 48. ...
 49. ...
 50. ...
 51. ...
 52. ...
 53. ...
 54. ...
 55. ...
 56. ...
 57. ...
 58. ...
 59. ...
 60. ...
 61. ...
 62. ...
 63. ...
 64. ...
 65. ...
 66. ...
 67. ...
 68. ...
 69. ...
 70. ...
 71. ...
 72. ...
 73. ...
 74. ...
 75. ...
 76. ...
 77. ...
 78. ...
 79. ...
 80. ...
 81. ...
 82. ...
 83. ...
 84. ...
 85. ...
 86. ...
 87. ...
 88. ...
 89. ...
 90. ...
 91. ...
 92. ...
 93. ...
 94. ...
 95. ...
 96. ...
 97. ...
 98. ...
 99. ...
 100. ...

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Azathioprin (Imurek ^R)	1
1.1.1	Indikationsbereiche	1
1.1.1.1	Organtransplantationen	1
1.1.1.2	Autoimmunkrankheiten	1
1.1.1.3	Erkrankungen, bei denen eine autoimmune Pathogenese diskutiert wird	2
1.1.2	Wirkungsweise von Azathioprin	2
1.1.3	Metabolismus	5
1.2	6-Mercaptopurin (Puri-Nethol ^R)	11
1.2.1	Indikationsbereiche	11
1.2.2	Metabolismus	11
1.2.2.1	6-Mercaptopurin-Auswirkungen auf den Purinstoffwechsel	11
1.2.2.2	Pharmakokinetik von 6-Mercaptopurin	18
1.2.3	Betrachtungen zur Wirkungsweise von 6-Mercaptopurin	19
1.3	Nitroimidazole	20
1.3.1	Metabolismus	20
1.3.2	Biologische Effekte der Nitroimidazole	22
1.3.2.1	Nitroimidazole als zytotoxische Substanzen gegenüber hypoxischen Zellen	23
1.3.2.2	Nitroimidazole als Radiosensitizer	27
1.3.2.3	Nitroimidazole als Chemosensitizer	30
1.4	Ziele der Untersuchungen	32

2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Zellen	33
2.2	Zellzüchtung	33
2.2.1	Auftauen der eingefrorenen Zellsuspensionen	33
2.2.2	Nährbedingungen	34
2.2.3	Kulturteilung	37
2.2.4	Tiefgefrieren der Zellkulturen	38
2.3	Zellzählung	38
2.4	Zellfärbung	39
2.5	Einstellung der Zellzahlen im Versuchsansatz	40
2.6	Testsubstanzen	41
2.7	Herstellung der Testlösungen	43
2.7.1	Herstellung des Lösungsmittels	43
2.7.2	Auswiegen der festen Substanzen	43
2.7.3	Pipettieren der flüssigen Substanz	44
2.7.4	Auflösen der Substanzen im Lösungsmittel	44
2.7.5	Sterile Filtration	44
2.8	Pipettieren der Substanzen in die Kultur- flaschen	45
2.9	Verwendetes Arbeitsmaterial	45
2.9.1	Sterile Gefäße	45
2.9.2	Sterile Pipettenspitzen und Eppendorf- Gefäße	46
3	ERGEBNISSE	47
3.1	Normales Wachstumsverhalten der Lympho- blastenkulturen LS_2 und CH_4	47
3.2	Wachstumsverlauf unter der Einwirkung der Testsubstanzen	52
3.2.1	Mögliche Effekte der Testsubstanzen auf das Kulturwachstum	52
3.2.2	Methode der Ergebnisdarstellung	53

3.2.3	Auswirkungen des Lösungsmittels auf das Zellwachstum	57
3.2.4	Zellwachstum nach Zugabe der Substanzen in einer Konzentration von 10^{-6} M	59
3.2.5	Zellwachstum nach Zugabe der Substanzen in einer Konzentration von 10^{-5} M	62
3.2.6	Zellwachstum nach Zugabe der Substanzen in einer Konzentration von 10^{-4} M	65
3.2.7	I ₂ -Verdünnungsreihe	68
3.3	Beeinflussung der Hemmwirkung durch Hypoxanthinzugabe	72
4	DISKUSSION	75
4.1	Definition von Zytotoxizität, Zytostase und PLD	75
4.2	Interpretation der Azathioprin-Wirkung	76
4.3	Interpretation der 6-Mercaptopurin-Wirkung	81
4.4	Interpretation der Imidazolwirkung	82
4.4.1	Konzentrationsabhängigkeit der Nitroimidazolwirkung	83
4.4.2	Subletale Konditionierung (PLD)	84
4.4.2.1	DNA-Einzelstrangbrüche	86
4.4.2.2	Bioreduktive Alkylierung	88
4.4.2.3	Wechselwirkungen mit intrazellulären Elektronen-Donatoren	88
4.4.3	Sensitizer-Wirkung	90
4.5	4-Nitroimidazole	92
4.5.1	Besondere Stellung in der Gruppe der Nitroimidazole	92
4.5.2	Immunsuppressive Potenz der getesteten Nitroimidazole	95

5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	LITERATUR	99

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
APRT	Adeninphosphoribosyltransferase
AZA	Azathioprin
BCNU	Bischloräthyl-nitrosourea
CCNU	Chloräthyl-cyclohexyl-nitrosourea
CH ₄	undifferenzierte Lymphoblasten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	fetales Kälberserum
5-FU	5-Fluorouracil
GMP	Guanosinmonophosphat
G ₀ -Phase	Ruhephase im Zellzyklus
G ₁ -Phase	Präsynthetische Wachstumsphase im Zell- zyklus
G ₂ -Phase	Postsynthetische Wachstumsphase im Zell- zyklus
GSH	reduziertes Glutathion
GZ(K)	relative Gesamtzellzahl, bezogen auf eine Kontrollkultur
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
I ₁	1-Methyl-5-Chlor-Imidazol
I ₂	1-Methyl-4-Nitro-5-Chlor-Imidazol
I ₃	1-Methyl-4-Nitro-5-Thio-Imidazol
IMP	Inosinmonophosphat (= Inosinsäure)
KHCO ₃	Kaliumbicarbonat
lag-Phase	stationäre Phase im Kulturwachstum
l-Glu	l-Glutamin
log-Phase	logarithmische Phase im Kulturwachstum

LS ₂	undifferenzierte Lymphoblasten
M	Mol
MNACI	1-Methyl-4-Nitro-5-(N-Acetyl-S-Cysteinyl)- Imidazol
MNGI	1-Methyl-4-Nitro-5-(S-Glutathionyl)- Imidazol
MNIC	S-(1-Methyl-4-Nitro-5-Imidazolyl)-Cystein
MNTI	1-Methyl-4-Nitro-5-Thio-Imidazol
6-MP	6-Mercaptopurin
N,N'-MNIC	N,N'-(S-(1-Methyl-4-Nitro)-Imidazolyl)- Cystin
OER	Oxygen-Enhancement-Ratio
PLD	subletale Konditionierung (= "potentially lethal damage")
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
PS	Penicillin-Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
S-Phase	DNA-Synthesephase
TIMP	Thioinosinmonophosphat (= Thioinosinsäure)
TZ(S)	prozentualer Anteil toter Zellen der mit der jeweiligen Substanz versetzten Zellen

1 EINLEITUNG

1.1 Azathioprin (Imurek^R)

Azathioprin ist ein Medikament, das inzwischen bei einer Vielzahl von Erkrankungen Anwendung findet. In hohen Dosen wirkt es antileukämisch, in niedriger Dosierung immunsuppressiv (94). Auf dem Gebiet der Immunsuppression hat es große Bedeutung erlangt.

1.1.1 Indikationsbereiche (90)

1.1.1.1 Organtransplantationen

Hierunter nehmen insbesondere Nierentransplantationen die hervorragendste Stellung ein. Azathioprin kommt hierbei vielfach in Kombination mit Steroiden (z.B. Prednison) zur Anwendung. Die Anwendung umfaßt sowohl den Zeitraum der Transplantation selbst, als auch die langfristige Verhütung von Abstoßungsreaktionen.

1.1.1.2 Autoimmunkrankheiten

Zu dieser Gruppe gehören:

- chronisch aggressive (lupoide) Hepatitis
- primär chronische Polyarthrit
- Lupus erythematodes visceralis
- autoimmune hämolytische Anämie
- Colitis ulcerosa
- Morbus Crohn
- Pemphigus vulgaris
- Dermatomyositis

1.1.1.3 Erkrankungen, bei denen eine autoimmune Pathogenese diskutiert wird

Auch bei den folgenden Erkrankungen führt die Behandlung mit Azathioprin nachweislich zu einer Besserung des klinischen Bildes:

spezielle Formen der chron. Glomerulonephritis
idiopathisch thrombozytopenische Purpura
Wegener' Granulomatose
Sklerodermie
Myasthenia gravis
Multiple Sklerose
Syndrome von Felty, Reiter, Sjögren, Goodpasture und Behçet.

1.1.2 Wirkungsweise von Azathioprin

Azathioprin wird der Gruppe der Antimetabolite zugeordnet und findet neben Amethopterin (Methothrexat^R) aus dieser Gruppe die häufigste Anwendung.

In der Gruppe der Antimetabolite werden Abwandlungsprodukte natürlicher Stoffe zusammengefaßt, die aufgrund ihrer Affinität zu Enzymen der Biosynthese von Nukleinsäurebasen wirken (kompetitive Enzyminhibitoren) (59).

Wichtige, bei der DNA-Synthese beteiligte Enzyme sind nun aber nicht während des gesamten Generationszyklus in gleicher Aktivität in den proliferationsfähigen Zellen vorhanden, sondern müssen in der DNA-Synthesephase oder unmittelbar davor neu gebildet werden. Enzyminhibitoren der DNA-Synthese können daher nur dann wirksam werden, wenn sie in genügend hoher Konzentration

intrazellulär angereichert sind, um einen Enzymblock während der gesamten Dauer eines Zellzyklus zu bewirken und dadurch die proliferierenden Zellen in der DNA-Synthesephase letal zu schädigen (94).

Außerdem kann der Nukleotidstoffwechsel proliferierender Zellen dadurch gestört werden, daß bestimmte Substanzen weiter metabolisiert werden und als falsche Nukleotide in die DNA oder RNA eingebaut werden (94).

Da während der DNA-Synthese ein besonders hoher Bedarf an Nukleotiden besteht, der bei einem Mangel an Vorstufen nicht gedeckt werden kann, ergibt sich, daß die Wirksamkeit der Antimetabolite vor allem in der S-Phase liegt, d.h., daß Antimetabolite S-Phasen-spezifisch zytotoxisch sind (59).

An teilweise hepatektomierten Ratten konnte gezeigt werden, daß Azathioprin die Anzahl der Zellen, die DNA synthetisieren, stärker herabsetzt als den DNA-Synthese-Anteil pro Zelle. Außerdem wurde gefunden, daß die DNA-Synthese im Vergleich zur RNA-Synthese durch Azathioprin stärker gehemmt wird, so daß durch erhöhten RNA/DNA bzw. Protein/DNA-Quotienten Leber-Regenerate mit vorzugsweise hypertrophischen Zellen gefunden wurden (45).

Azathioprin unterdrückt die Proliferation sowohl von T- als auch von B-Lymphozyten, nachdem sie bereits Antigen-determiniert sind. Wegen der im Verhältnis zum gesamten Proliferationszyklus proliferierender Zellen nur kurzdauernden DNA-Synthesephase ist der immunsuppressive Effekt auf die Antikörperbildung speziell dann nachweisbar, wenn sie unmittelbar vor oder nach der Antigen-Stimulation, d.h. am ersten und zweiten Tag vor bzw. nach der Immunisierung eingesetzt werden (95).

Über den genauen Mechanismus der Immunregulation sind derzeit Untersuchungen im Gange, die sich insbesondere mit der Wirkung auf spezielle Lymphoblastensubpopulationen befassen (17, 50, 69).

Im Gegensatz zu der genannten Wirkungsweise von Azathioprin im Sinne einer Antimetabolitenwirkung stehen Beobachtungen, nach denen die DNA-Synthese durch Azathioprin nicht behindert werden soll, sondern nach denen durch Azathioprin speziell eine Verlängerung der späten S-Phase oder ein Stehenbleiben der Zell-Proliferation in der G_2 -Phase bewirkt werden soll (25, 92).

Die einzelnen Phasen des Zellzyklus sind in Abbildung 1 dargestellt.

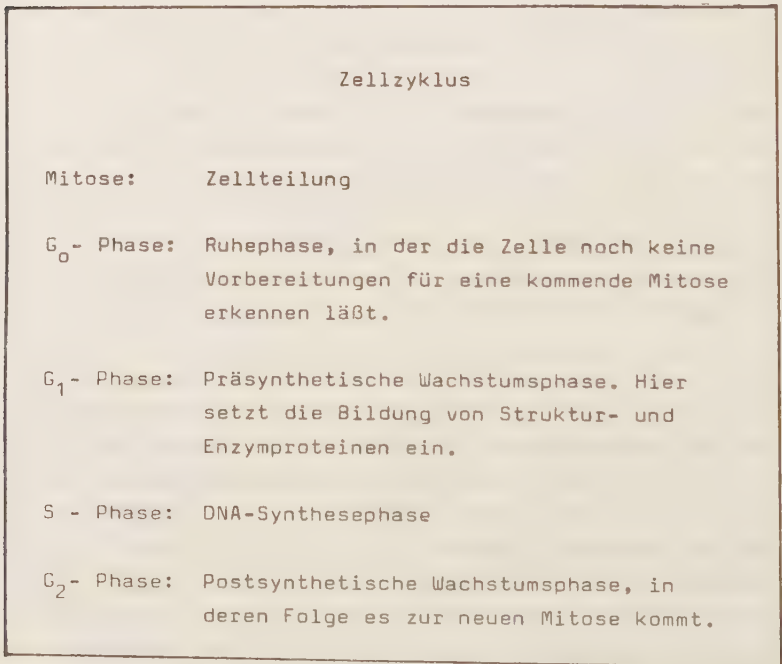


Abbildung 1 Phasen des Zellzyklus, modifiziert nach (43).

Azathioprin entfaltet außerdem eine unspezifische antiphlogistische Wirkung, welche ebenfalls die Phagozytose, Antigen-Antikörper-Reaktionen und toxische Wirkungen von Antigen-Antikörper-Komplexen auf den Organismus beeinflusst. Dies spielt besonders bei den Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle, da hier bereits eine Sensibilisierung gegenüber Organ-Antigenen stattgefunden hat, so daß die therapeutische Beeinflussung der sekundären Reaktionen von Bedeutung ist (95).

Ein Teilaspekt dieser unspezifischen antiphlogistischen Wirkung ist die deutlich verminderte Anzahl von Monozyten und Makrophagen am Entzündungsort (25).

Die Wirkung von Azathioprin wird auf seine beiden hauptsächlich in vivo entstehenden Metabolite zurückgeführt. Dies ist zum einen 6-Mercaptopurin, dem früher fast ausschließlich die immunsuppressive Wirkung von Azathioprin zugeschrieben wurde, zum anderen ein Imidazol-derivat, dessen Bedeutung erst in jüngerer Zeit erkannt wurde, da die Azathioprin-Wirkung diejenige von 6-Mercaptopurin deutlich übertraf.

1.1.3 Metabolismus

Beim Azathioprin handelt es sich um ein 6-(1-Methyl-4-Nitro-Imidazol-5-yl)-Thiopurin. Aufgrund seiner Struktur kann es als ein imidazolyl-substituiertes 6-Mercaptopurin aufgefaßt werden, obwohl es sich in pharmakologischer Sicht erheblich anders als 6-Mercaptopurin verhält. Die Strukturformel ist in Abbildung 2 dargestellt.

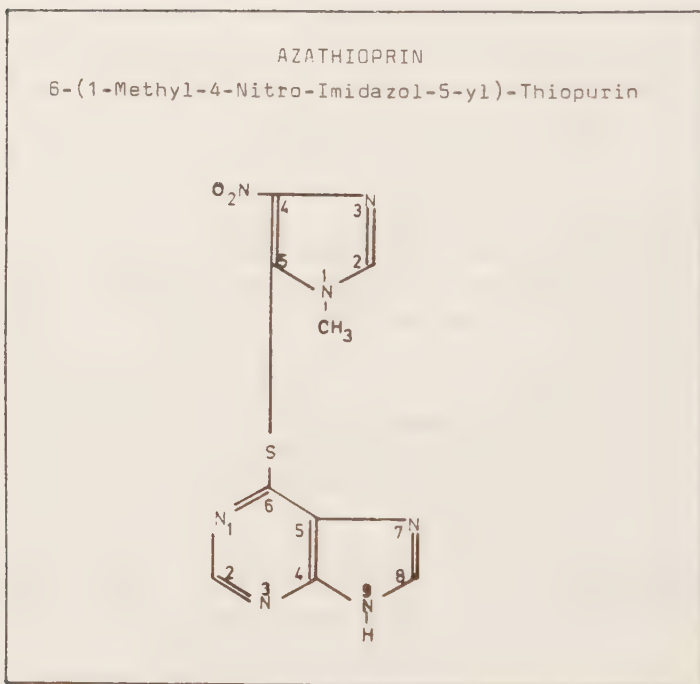


Abbildung 2 Strukturformel des Azathioprin-Moleküls
mit Numerierung der Ringatome

Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 277,29 und ist löslich in Alkoholen, Dimethylformamid und in alkalischen Lösungen unter langsamer Zersetzung.

Rund 38 % der verabreichten Azathioprin-Dosis werden im Magen-Darm-Trakt resorbiert, etwa 12. % werden unverändert mit den Faeces ausgeschieden. Die Resorption erfolgt rasch; die Substanz erscheint innerhalb weniger Minuten im Blut. Maximale Blutspiegel werden - bestimmt durch die Aktivität von ^{35}S -Azathioprin - 2 Stunden nach oraler Verabreichung erhalten. Die Konzentration

beträgt hierbei 2 $\mu\text{g/ml}$ für Azathioprin und seine Metabolite zusammen, was einer Konzentration von $7,2 \times 10^{-6} \text{ M}$ entspricht (90).

Wie Versuche mit ^{14}C -Azathioprin am Hund zeigen (^{14}C an den C-Atomen 4 und 5 des Imidazolrings), wird Azathioprin gespalten, sobald es die intrazellulären Orte im Blut und in der Leber, welche reich an Glutathion sind, erreicht hat (54).

Nach Untersuchungen an Ratten erfolgt der Beginn der Aufspaltung in den Leberzellen sofort, in den roten Blutzellen mit einer gewissen Verzögerung, gemessen an der Abnahme der Glutathion-Konzentration dieser beiden Zellsysteme (37).

Ebenfalls an Ratten wurde festgestellt, daß es nach Spaltung von Azathioprin in Abhängigkeit vom jeweiligen Zellsystem bei gleichem Imidazol-Stoffwechsel zu unterschiedlichem Purinmetabolismus kommt. So wurde als Hauptprodukt des Purinstoffwechsels in der Leber durch die Anwesenheit von Xanthin-Oxidase Thioharnsäure gefunden, in den Erythrozyten, in denen dieses Enzym nur in unerheblichen Mengen vorkommt, lag der größte Teil des Purins als 6-Mercaptopurin vor (53).

Ob und in welchem Ausmaß die Spaltung von Azathioprin in vivo enzymatisch oder nicht-enzymatisch erfolgt, ist noch nicht vollständig geklärt. Obwohl eine nicht-enzymatische Spaltung nur durch Anwesenheit SH-haltiger Substanzen wie beispielsweise Glutathion angenommen wird (26, 90), sprechen andere Beobachtungen doch für eine enzymatische Spaltung, möglicherweise durch die Glutathion-S-Transferase.

So wird beispielsweise die in vitro-Umwandlung von Azathioprin durch ein Enzym katalysiert, das in seinem Molekulargewicht, bestimmt durch Gelfiltration, der Hemmungskinetik durch Probenecid, einem exogenen (38) und Bilirubin, einem endogenen Transferasehemmstoff, der Induktion durch Phenobarbital und der Organverteilung der Glutathion-S-Transferase entspricht (36). Ob die in vitro-Aufspaltung von Azathioprin enzymatisch oder nicht-enzymatisch erfolgt, ist auch von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. So sollen bei einem pH von 6,5 80%, bei einem pH von 8,0 jedoch nur 14% enzymatisch aufgespalten werden (36). Es wird vermutet, daß in vivo in der Leber die enzymatische Thiolyse von Azathioprin vorherrscht (38).

Die Abbaureaktionen werden durch die Spaltung der Thioätherbrücke zwischen dem Purin- und dem Imidazolring eingeleitet. Auf jeden Fall ist die Anwesenheit von Glutathion, dem in vivo die größte Bedeutung als Sulfhydryl-Gruppen-Donator bei dieser Reaktion zugeschrieben werden kann, notwendig, um eine quantitativ ausreichende Aufspaltung in 6-Mercaptopurin und ein Imidazolderivat zu erhalten (11, 54).

So wurde z.B. festgestellt, daß die Spaltung von Azathioprin bei Inkubation zum einen von einem Ratten-Leber-Homogenat, zum anderen von Blut-Plasma mit PCMP (p-Chloro-mercurobenzoe-Säure), welches mit Sulfhydrylgruppen reagiert und diese damit blockiert, kaum stattfand (53).

Die Spaltung scheint in erster Linie durch einen nukleophilen Angriff auf das C-5-Atom des Imidazolrings stattzufinden. Allerdings wurde in Versuchen mit ^{35}S markiertem Azathioprin nachgewiesen, daß 10 % des ^{35}S im Urin als 1-Methyl-4-Nitro-5-Thioimidazol vorliegen. Die Tatsache, daß der Imidazolanteil ^{35}S enthält, weist darauf

nin, daß die Aufspaltung von Azathioprin nicht ausschließlich durch nukleophilen Angriff auf das C-5-Atom erfolgt, sondern auf beiden Seiten des S-Atoms stattfinden kann. Daraus ergibt sich, daß aus einem Mol Azathioprin nicht ein Mol 6-Mercaptopurin entstehen muß (21).

Außerdem kann Azathioprin durch die Aldehyd-Oxidase (Versuche am Kaninchen und am Meerschweinchen) zu 8-Hydroxy-Azathioprin oxidiert werden (13). Die nachfolgende Reaktion mit Glutathion oder anderen nukleophilen Substanzen würde 8-Hydroxy-6-Thiopurin freisetzen, welches durch die Xanthin-Oxidase zu Thioharnsäure umgewandelt wird (21).

Diesem Stoffwechselweg mittels der Aldehyd-Oxidase wird beim Menschen allerdings keine große Bedeutung zugemessen (73); dies kann auch dadurch belegt werden, daß aus Azathioprin weniger Thioharnsäure entsteht als aus 6-Mercaptopurin (20).

Man nimmt an, daß es bei der Aufspaltung des Azathioprin-Moleküls hauptsächlich zu den folgenden, in Abbildung 3 mit ihren Strukturformeln aufgezeichneten Reaktionsprodukten kommt (11).

Die beiden Hauptmetabolite des Azathioprin, 6-Mercaptopurin und ein Imidazolderivat, sollen nun gesondert besprochen werden.

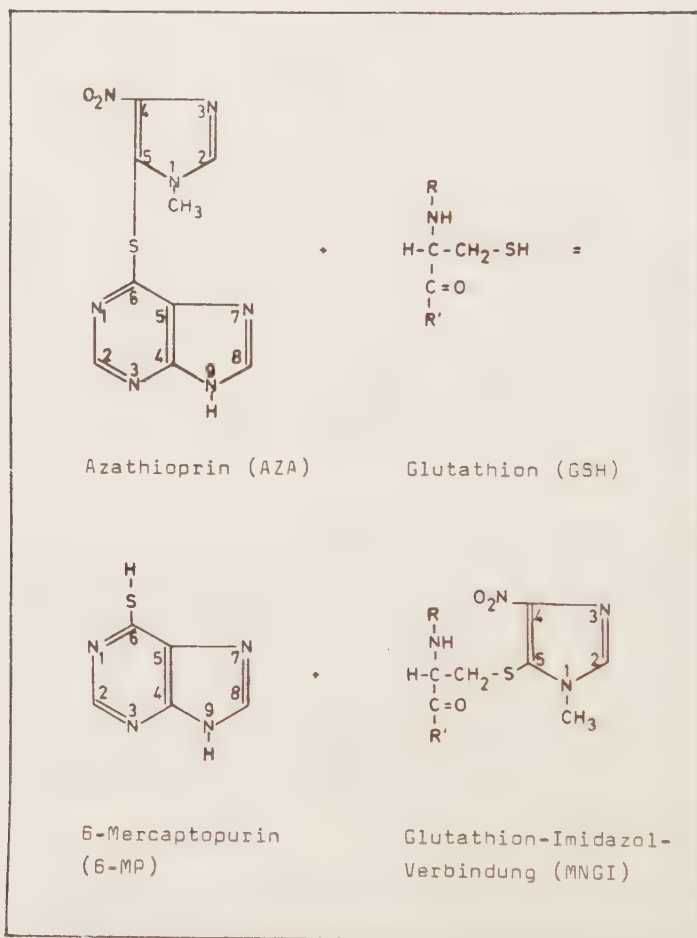


Abbildung 3 Reaktion von Azathioprin mit Glutathion.
 R = L-Glutamyl, R' = Glycin

1.2 6-Mercaptopurin (Puri-Nethol^R)

6-Mercaptopurin (6-MP) gehört zur Gruppe der Purinantagonisten. Es wurde 1951 von Elion und Hitchings synthetisiert und unterscheidet sich chemisch vom Hypoxanthin dadurch, daß die OH-Gruppe am C-Atom 6 durch eine SH-Gruppe ersetzt ist (94). Die Strukturformel von 6-Mercaptopurin ist in Abbildung 3, S. 10 dargestellt.

1.2.1 Indikationsbereiche

Akute lymphatische Leukämie des Kindes
Akute Leukämie des Erwachsenen
Chorionepitheliom
Chronisch myeloische Leukämie (vorwiegend im Blastenschub)

1.2.2 Metabolismus

Als Purinantagonist zeigt 6-Mercaptopurin sowie seine Derivate multiple Interaktionen mit Enzymen aus dem Purinmetabolismus. Diese werden im folgenden kurz dargestellt.

1.2.2.1 6-Mercaptopurin-Auswirkungen auf den Purinstoffwechsel

Ein Teil der durch intrazellulären Abbau von Nukleinsäuren entstehenden Purinbasen wird über den Reutilisationsweg (= "salvage pathway") wieder für den Einbau in neue Ribo- bzw. Desoxyribonukleinsäuren genutzt.

Für die Reutilisierung der Purinbasen Adenin, Hypoxanthin und Guanin stehen zwei Enzyme zur Verfügung. Durch die Adeninphosphoribosyltransferase (APRT) wird Adenin in einer PRPP-abhängigen Reaktion in Adenosinmonophosphat umgewandelt. Das Enzym wird durch Adennukleotide (insbesondere AMP) gehemmt. Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) ist für die Wiedereinführung von Hypoxanthin und Guanin in den Nukleotidstoffwechsel verantwortlich (44).

6-Mercaptopurin wird analog den physiologischen Purinbasen Hypoxanthin, Guanin und Adenin durch Reaktion mit PRPP (Phosphoribosylpyrophosphat) in die Ribotidform umgewandelt (94). Dieser Anabolismus von 6-Mercaptopurin zu seiner biologisch aktiven Form, der Thioinosinsäure (TIMP, Thioinosinmonophosphat), entspricht einer enzymatisch gesteuerten Medikamentaktivierung, die intrazellulär mit Hilfe der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) stattfindet.

6-Mercaptopurin ist sowohl ein Substrat als auch ein kompetitiver Hemmstoff für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase. Auf diese Weise werden über den Reutilisationsweg zum einen weniger, zum anderen falsche Bausteine für die RNA- und DNA-Synthese bereitgestellt (21).

In Abbildung 4 ist der Purinreutilisationsweg und seine Beeinflussung durch 6-Mercaptopurin dargestellt.

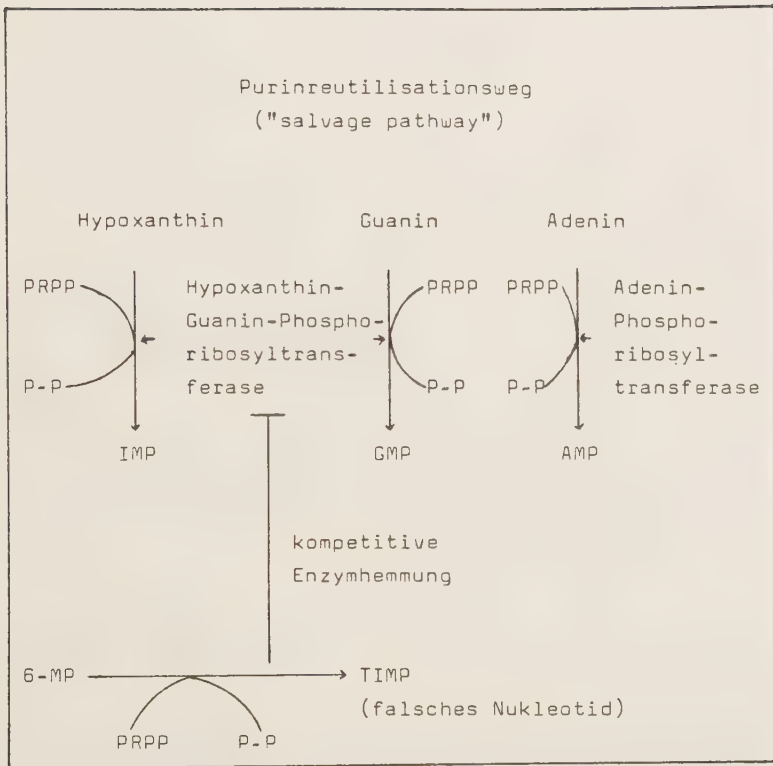


Abbildung 4 Reutilisierungswege der Purinbasen und deren Beeinflussung durch 6-Mercaptopurin

Die entstehende Thioinosinsäure (TIMP) wiederum ist selbst Hemmstoff mehrerer Enzyme des Purinstoffwechsels.

Sie hemmt zum einen die Glutamin-5-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (PRPP-Amidotransferase), das Enzym, welches den ersten Schritt der Purinbiosynthese katalysiert und auch das regulatorische Enzym der Purinbiosynthese darstellt. Es wird durch Mononukleotide gehemmt, die Adenosin, Inosin oder Guanosin enthalten. Auf diese Weise wird durch allosterische Hemmung die Purinbiosynthese gedrosselt, wenn ausreichende Mengen an Purinnukleotiden vorhanden sind. Hier greift auch das Struktur analog Thioinosinsäure in den Rückkopplungsmechanismus ein, der die Neusynthese der Purine reguliert (Pseudo-Feedback-Reaktion) (44, 59).

Thioinosinsäure kann S-methyliert werden und das entstehende Methyl-Thiopurin-Ribonukleotid verursacht eine noch stärkere Feedback-Hemmung der PRPP-Amidotransferase als Thioinosinsäure (21).

Abbildung 5 zeigt ein Schema der Purin-de-novo-Synthese, in das die Hemmwirkung durch 6-Mercaptopurin-Metabolite eingetragen ist.

Inosinmonophosphat (Inosinsäure, IMP) ist die Vorstufe von Adenosin- und Guanosinmonophosphat (AMP und GMP). Die Strukturähnlichkeit der Thioinosinsäure mit der Inosinsäure führt zu einer Hemmung der Enzyme, die diese in Xanthinsäure und Adenylsuccinat überführen (59). Hierbei handelt es sich um die Adenylsuccinat-Synthetase, die Adenylsuccinat-Lyase und die IMP-Dehydrogenase. Dies ist in Abbildung 6 dargestellt.

Purin-de-novo-Synthese

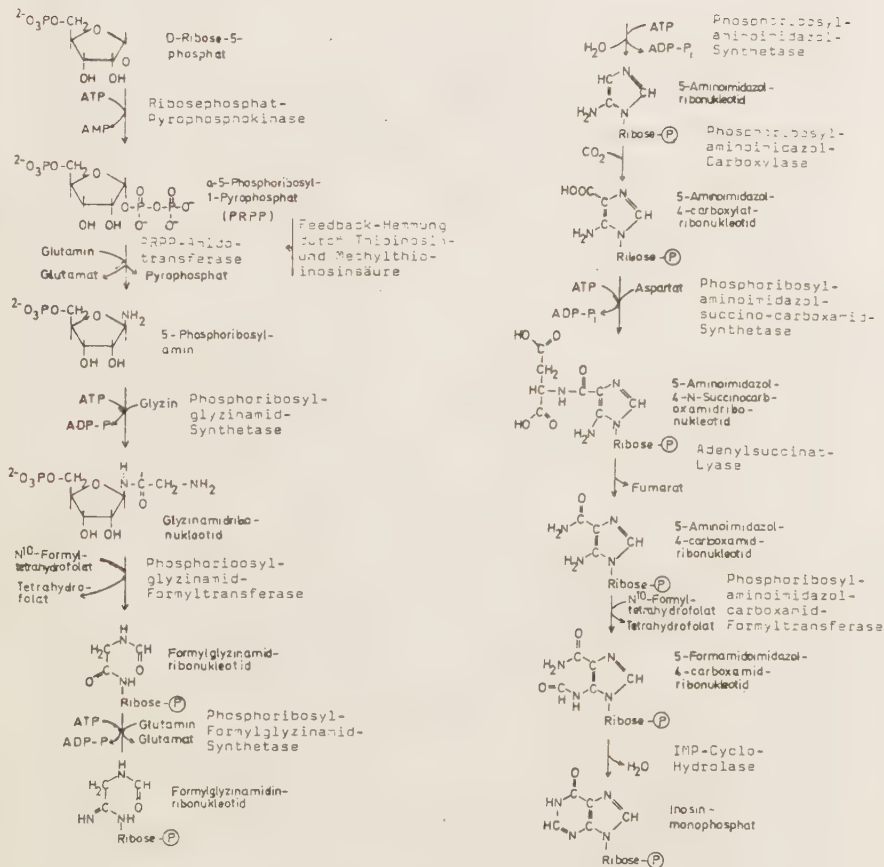


Abbildung 5 Reaktionen der Purinsynthese, modifiziert nach (44). Die Wirkung durch 6-MP-Metabolite ist eingezeichnet.

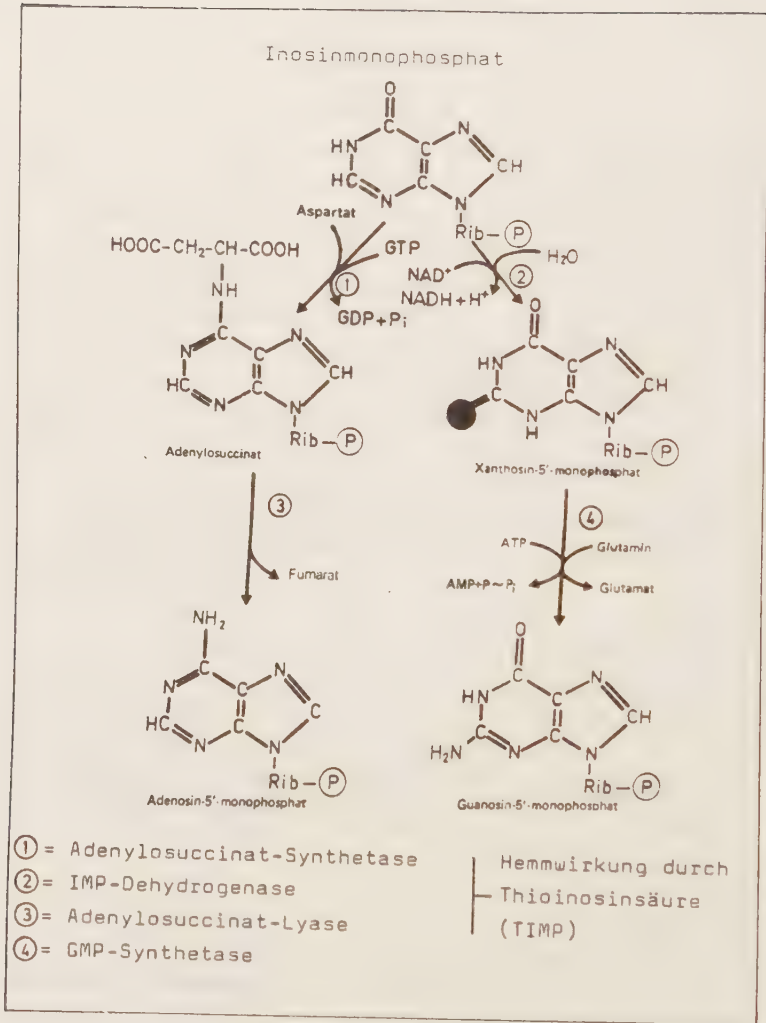


Abbildung 6 Biosynthese von AMP und GMP aus IMP mit Be-
einflussung durch 6-MP-Derivate, mod. nach
(44).

Bei Untersuchungen mit ^{35}S -markiertem 6-Mercaptopurin wurden ^{35}S -Thioguanin-Deoxyriboside gefunden. Damit könnten sich auch Thioinosinate und/oder Thioguanilate als Substrate für Kinasen, Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktasen, DNA-Polymerasen etc. ergeben (21). Um die Wechselwirkungen der einzelnen Nukleoside aufzuzeigen, ist in Abbildung 7 ein Schema des Purinabbaus dargestellt.

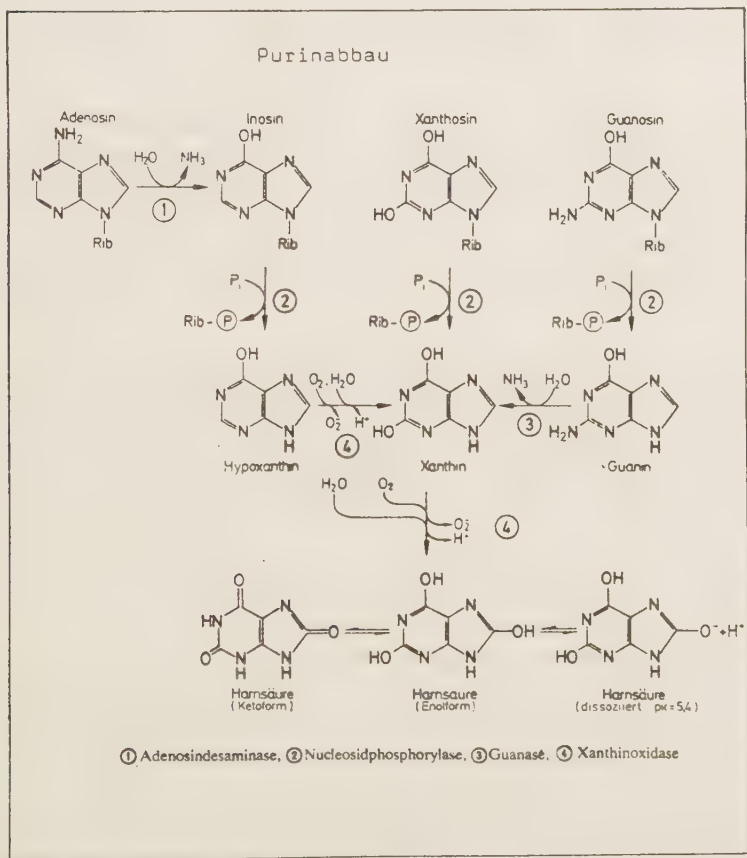


Abbildung 7 Reaktionen des Purinabbaus (42).

Nicht in seine biologisch aktive Form umgewandeltes 6-Mercaptopurin wird, wie in Abbildung 8 dargestellt, durch die Xanthin-Oxidase im Sinne einer Entgiftungsreaktion in die immunsuppressiv unwirksame 6-Thioharnsäure umgewandelt und renal eliminiert.

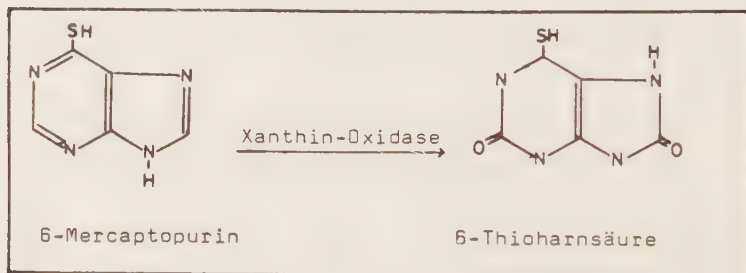


Abbildung 8 Abbau von 6-Mercaptopurin durch die Xanthin-Oxidase

Durch Hemmung der Xanthin-Oxidase, beispielsweise durch Allopurinol, kann der Abbau des zugeführten 6-Mercaptopurins zur Thioharnsäure vermindert und dadurch die Wirkung von 6-Mercaptopurin gesteigert werden (59).

1.2.2.2 Pharmakokinetik von 6-Mercaptopurin

Wie bereits in 1.2.2.1, S. 11 erwähnt, erfolgt die Umwandlung von 6-Mercaptopurin in Thioinosinsäure und seine biologisch aktiven Derivate (z.B. Methylthioinosinsäure, Thioguanylsäure etc.) intrazellulär. Da die Nukleotide die Zellmembran nicht durchdringen können ohne dephosphoryliert zu werden, zirkulieren sie weder im Plasma noch werden sie im Urin ausgeschieden. Demzufolge hat die Bestimmung der Plasmaspiegel von 6-Mer-

captopurin bzw. Azathioprin keine große Relevanz im Hinblick auf die therapeutische Effektivität (21).

Die toxischen Effekte der Thioinosinsäure bzw. der verwandten Nukleotide auf die Zellteilung sind noch manifest, lange nachdem das Medikament bzw. seine Metabolite die Blutbahn verlassen haben (21).

1.2.3 Betrachtungen zur Wirkungsweise von 6-Mercaptopurin

Wie in 1.2.2.1, S. 11 ff beschrieben, hat 6-Mercaptopurin multiple Angriffspunkte im Purinstoffwechsel. Ob nun einer der genannten Mechanismen oder das Zusammenwirken aller Einflüsse die antileukämische bzw. immunsuppressive Wirkung bedingen, oder ob noch unerkannte Mechanismen dazu wesentlichen Beitrag leisten, bleibt unklar.

1.3 Nitroimidazole

Das Ziel dieser Arbeit ist es, nachzuweisen, daß dem Nitroimidazolanteil ein möglicherweise beträchtlicher Teil an der immunsuppressiven Wirkung von Azathioprin zuzuschreiben ist. Dazu erscheint es notwendig, näher auf Metabolismus sowie biologische Effekte dieser Substanzgruppe einzugehen.

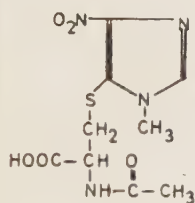
1.3.1 Metabolismus

Versuche mit ^{14}C markiertem Azathioprin (an den C-Atomen 4 und 5) am Hund geben einige Hinweise auf mögliche Stoffwechselschritte in vivo (54).

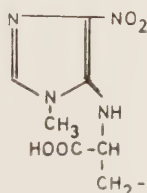
Azathioprin wird hauptsächlich durch einen nukleophilen Angriff auf das C_5 -Atom des Imidazolringes gespalten; in erster Linie durch Glutathion mittels seiner Sulfhydryl-Gruppe, was 6-Mercaptopurin und MNGI (1-Methyl-4-Nitro-5-(S-Glutathionyl)-Imidazol) ergibt (11, 21, 53) (s. Abb. 3, S. 10). In einem geringeren Ausmaß können auch Proteine und möglicherweise Peptide und Aminosäuren Azathioprin spalten (53, 54). Das gebildete MNGI wird nicht, bzw. nur in ganz geringem Maße, als solches ausgeschieden. Es ist ein Vorläufer der ausgeschiedenen Metabolite. Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, daß nach einer MNGI-Gabe dieselben Metabolite entstehen (54).

Trotz intensiver Bemühungen ist es noch nicht gelungen, den Metabolismus der Imidazole in vivo weiter als bis zum MNGI zu verifizieren. Allerdings konnten inzwischen einige Ausscheidungsmetabolite charakterisiert werden, die sowohl nach Azathioprin als auch nach MNGI-Gabe entstanden. Diese sind in Abbildung 9 mit ihren Strukturformeln aufgezeichnet.

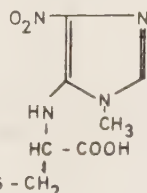
Ausscheidungsprodukte aus dem Imidazolstoffwechsel



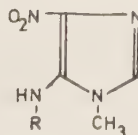
MNACI



N,N'-MNIC



MNTI



5-substituierte
Amino-1-Methyl-
4-Nitro-Imidazole

Abbildung 9 Strukturformeln der Ausscheidungsprodukte aus dem Imidazolstoffwechsel (54).

MNACI (1-Methyl-4-Nitro-5-(N-Acetyl-S-Cysteinyl)-Imidazol)

Diese Verbindung ist der vorherrschende Imidazol-Metabolit in der Ausscheidung der Ratte, beim Hund erscheint er nur in 0,5 % der Azathioprin-Dosis. Da ein annähernd übereinstimmendes Ausscheidungsprofil zwischen Mensch und Hund nachgewiesen werden konnte, dürfte dieser Metabolit auch beim Menschen keine hervorragende Stellung einnehmen (54).

N,N'-MNIC (N,N'-(S-(1-Methyl-4-Nitro)Imidazolyl)Cystin)

Die Biotransformation von MNGI zu N,N'-MNIC könnte S-(1-Methyl-4-Nitro-5-Imidazolyl)Cystein (MNIC) als Zwischenprodukt enthalten. N,N'-MNIC scheint größere Bedeutung zu haben, da 4-6 Stunden nach oraler ^{14}C -Azathioprin-Gabe im Urin eines Patienten 34 % der ^{14}C -Radioaktivität als N,N'-MNIC gefunden wurden, was immerhin 5 % des gegebenen radioaktiven Medikamentes ausmacht. Es ist der dominierende Ausscheidungsmetabolit bei Mensch und Hund.

Außerdem wurden MNTI (1-Methyl-4-Nitro-5-Thioimidazol) und 5-substituierte Amino-1-Methyl-4-Nitro-Imidazole gefunden.

1.3.2 Biologische Effekte der Nitroimidazole

Nitroimidazole sind, neben ihrer guten Wirksamkeit auf Anaerobier, durch die folgenden Eigenschaften zu ihrer heute beträchtlichen Bedeutung gelangt:

- 1) Zytotoxizität, besonders gegenüber hypoxischen Zellen
- 2) Radiosensibilisierung
- 3) Sensibilisierung bevorzugt hypoxischer Zellen für die Chemotherapie

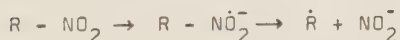
Trotz intensiver Forschung ist es bis heute nicht gelungen, die molekularen Mechanismen der Imidazolwirkung vollständig zu klären. Einigkeit besteht darüber, daß bei allen genannten Eigenschaften Redox-Reaktionen zwischen dem Nitroimidazol und intrazellulären Strukturen zugrunde liegen. Darüber wird ausführlich in 4.4, S. 82 ff diskutiert. Im folgenden soll auf die drei oben genannten Eigenschaften der Nitroimidazole eingegangen werden.

1.3.2.1 Nitroimidazole als zytotoxische Substanzen gegenüber hypoxischen Zellen

Im Verlauf der Experimente, die mit Nitroimidazolen als Radiosensitizern durchgeführt wurden, hier besonders mit Metronidazol, über welches wegen seiner guten Wirksamkeit bei Infekten mit anaeroben Mikroorganismen schon Erfahrungen in vivo vorlagen und Misonidazol, das sich in vitro als potenter Radiosensitizer erwiesen hatte, stellte sich heraus, daß Nitroimidazole neben ihren radiosensibilisierenden Eigenschaften auch eine selektive Zytotoxizität gegenüber hypoxischen Zellen entwickeln (22, 31, 56).

Eine Toxizität gegenüber gut oxygenierten Zellen wurde zwar ebenfalls festgestellt, allerdings erst nach langen Expositionszeiten, oder, für dieselbe Expositionsdauer, bei Konzentrationen, die um das 15 - 50 fache höher lagen als die zur Zytotoxizität gegenüber hypoxischen Zellen benötigten Konzentrationen (56, 82).

Zunächst nahm man an, daß als Ursache für die Zytotoxizität das Ein-Elektronen-Radikal-Anion des Nitroimidazols verantwortlich sein könnte, das in Nitrit, welches selbst keine toxische Wirkung auf die DNA hat, und ein Imidazol-Radikal zerfällt, welches dann zu einem DNA-Schaden führen könnte (18):



Daraus ergibt sich jedoch kein Grund für die Wirkungspräferenz auf hypoxische Zellen, da die Reduktion der $R - NO_2$ -Gruppe in ein Radikal-Anion $R - \dot{N}O_2^-$ unter aeroben und hypoxischen Bedingungen im selben Ausmaß stattfindet.

So kam man zu der Ansicht, daß weitere Reduktionsprodukte, die nur unter hypoxischen Bedingungen gebildet werden, für die gesteigerte Zytotoxizität hypoxischer Zellen verantwortlich sein könnten.

Whitmore et al. (91) fanden, daß Zellen aus Misonidazol mindestens drei Derivate bilden. Zwei der erhaltenen Produkte, von denen das eine eine vollständig reduzierte NO_2 -Gruppe, also ein Amin, enthielt und das andere wahrscheinlich teilweise reduzierte Intermediate, also entweder Nitroso-Verbindungen oder Hydroxylamine, wurden ausschließlich unter hypoxischen Bedingungen gebildet, waren dann aber gleich toxisch, sowohl für hypoxische als auch für gut oxygenierte Zellen. Das Produkt mit der nicht vollständigen Reduktion erwies sich als stärker zytotoxisch.

Man könnte also sagen, daß Nitroimidazole zur Bildung toxischer Intermediate hypoxische Bedingungen brauchen (60, 76, 91). Für die Wirkungsweise bestehen zwei Möglichkeiten:

- 1) Die Reduktionsprodukte sind selbst toxisch und interagieren mit Zell-Makromolekülen (40, 61, 85, 86). Die unter hypoxischen Bedingungen gebildeten Verbindungen haben dann nicht nur Auswirkungen auf die Zellen, in denen sie gebildet werden, sondern sie können auch oxygenierte Zellen in der Umgebung eines Tumors oder normales Gewebe letal schädigen (56, 82, 91). Damit in Einklang zu bringen wäre die Tatsache, daß mit steigenden Misonidazol-Konzentrationen die Toxizität weniger spezifisch für hypoxische Zellen wird (60).
- 2) Der Reduktionsprozeß interferiert mit dem Zellmetabolismus, speziell mit biochemischen Stoffwechselschritten, die für das Überleben von Zellen unter hypoxischen Bedingungen notwendig sind (8).

Für die selektive Zytotoxizität der Nitroimidazole gegenüber hypoxischen Zellen besteht eine Abhängigkeit von der Art des verwendeten Nitroimidazols (55), der Konzentration (31, 55, 60, 63, 76, 77), der Expositionsdauer (53, 63, 76), der Temperatur (29, 55, 63, 76), dem Zell- bzw. Tumortyp (55) und der Sauerstoff-Konzentration (55).

Die Abhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von der Art des Nitroimidazols, dessen Konzentration und der Expositionsdauer ist mit der notwendigen Metabolisierung zu toxischen Intermediaten zu erklären (31, 55, 56, 65, 76).

Die Zytotoxizität gegenüber hypoxischen Zellen zeigt eine deutliche Temperaturabhängigkeit (29, 55, 65, 75, 76, 78). Es stellte sich heraus, daß die Steigerung der Zytotoxizität durch Temperaturerhöhung abhängig von der Elektronenaffinität einer Nitroimidazolverbindung ist.

Die Elektronenaffinität (E_7^1) ist das Ein-Elektronen-Reduktionspotential, bestimmt durch Puls-Radiolyse und gemessen bei einem pH-Wert von 7.

Für die Nitroimidazole gelten folgende Elektronenaffinitäten, die hier im Vergleich zu O_2 und in Folge fallender Elektronenaffinität aufgeführt sind (2, 87):

O_2	$E_7^1 = -155 \text{ mV}$
2-Nitroimidazole (z.B. Misonidazol,	$E_7^1 = -389 \text{ mV}$)
5-Nitroimidazole (z.B. Metronidazol,	$E_7^1 = -486 \text{ mV}$)
4-Nitroimidazole, 5-substituiert	$E_7^1 \approx -550 \text{ mV}$

Elektronenanziehende Substituenten am Imidazolring können die Elektronenaffinität beträchtlich steigern (4, 87); die Effekte von derart substituierten Verbindungen können jedoch nie genau vorhergesagt werden (58).

Für die Temperaturabhängigkeit fand man beim Vergleich von drei Nitroderivaten mit unterschiedlicher Elektronenaffinität, daß Metronidazol, das Derivat mit der niedrigsten Elektronenaffinität ($E_7^1 = -486 \text{ mV}$) die größte Steigerung der Zytotoxizität durch eine Temperaturerhöhung von 34°C auf 41°C erfuhr, wogegen Nitrofurantoin, welches die höchste Elektronenaffinität aufwies ($E_7^1 = -264 \text{ mV}$), die geringste Wirkungssteigerung bei entsprechender Temperaturerhöhung zeigte. Misonidazol ($E_7^1 = -389 \text{ mV}$) lag zwischen den beiden Derivaten (65).

Dies ist dahingehend zu interpretieren, daß die toxischen Verbindungen mit ihrer hohen Elektronenaffinität niedrigere Aktivierungsenergien brauchen als Substanzen mit niedriger Elektronenaffinität, denen durch konstante Temperaturerhöhung ständig neue Aktivierungsenergie zugefügt werden kann und die so ihre Wirkung erst richtig entfalten können (65).

Diese Wirkungssteigerung bei Temperaturerhöhung ist besonders deswegen interessant, da sich dadurch, soweit eine Temperatursteigerung in vivo möglich ist, zur Erreichung einer definierten Zytotoxizität niedrigere Konzentrationen des Nitroderivates ergeben würden (78).

Für die drei genannten Verbindungen Metronidazol, Misonidazol und Nitrofurantoin wurde auch die Abhängigkeit vom pH-Wert geprüft. Man fand, daß mit Erniedrigung des pH-Wertes bei allen drei Derivaten eine Zytotoxizitätssteigerung auftrat. Diese Experimente wurden bei einer Temperatur von 37°C und von 41°C durchgeführt (65).

Da nun speziell hypoxische Zellen, wie sie z.B. in den inneren Schichten eines Tumors gefunden werden, auf die anaerobe Glykolyse angewiesen sind und es so zu einer Ansäuerung des Milieus kommt, könnte sich daraus zumin-

dest ein Teil der Wirkungspräferenz von elektronenaffinen Sensitizern auf hypoxische Zellen erklären lassen (65).

1.3.2.2 Nitroimidazole als Radiosensitizer

Bedeutung erlangten die Nitroimidazole, nachdem Grey et al. 1953 (27) die Existenz von hypoxischen Zellen in vivo nachgewiesen hatten und sie für einen wesentlichen Faktor beim Mißlingen der Radiotherapie bösartiger Erkrankungen hielten. Die Strahlensensibilität hypoxischer Tumorzellen, wie sie zumeist in den inneren Anteilen eines Tumors vorherrschen, soll im Vergleich zu euoxischen Zellen um einen Faktor von nahezu drei reduziert sein (35, 58).

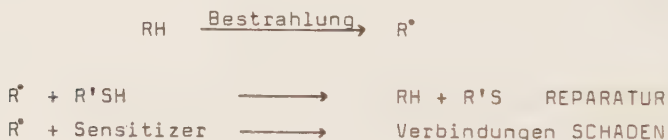
Damit begann die Suche nach Substanzen, die auch die hypoxische Zelle strahlungssensibel machen sollten. In Abbildung 10 sind die Bedingungen aufgezählt, die an einen idealen Radiosensitizer gestellt werden

Radiosensitizer

- 1) Selektivität für hypoxische Zellen
- 2) Transportfähigkeit in hypoxische Zellen
- 3) Ausreichende Metabolisierung, so daß wirkungsvolle Radiosensibilisierungs-Konzentrationen entstehen
- 4) Effektivität gegen Zellen in allen Phasen des Zellzyklus
- 5) Geringe Toxizität in therapeutischen Dosen
- 6) Effektivität bei fraktionierter Bestrahlung

Abbildung 10 Bedingungen, die an einen idealen Radiosensitizer gestellt werden (58).

Ursprünglich wurde Metronidazol zur Erforschung der Radiosensibilisierungs-Aktivität ausgewählt (23). Man nahm an, daß die Nitrogruppe schnell mit bestrahlungs-induzierten Radikalen zu reagieren vermag, so daß diese ihren Bestrahlungsschaden durch Übernahme eines Wasserstoff-Ions von endogen protektiven Molekülen nicht mehr rückgängig machen könnten (6). Dazu diene folgendes Modell:



Bereits 1963 wurde von Adams und Dewey angenommen, daß sich die Elektronenaffinität qualitativ auf die Radiosensibilisierungs-Effektivität bezieht (3). Einige Jahre später konnte nachgewiesen werden, daß die in vitro-Radiosensibilisierungs-Effektivität auch quantitativ mit der Elektronenaffinität korreliert (2, 4).

Für eine Vielzahl organischer Verbindungen erhielt man eine Beziehung zwischen der Radiosensibilisierungs-Effektivität und der Elektronenaffinität gemäß folgender Gleichung (2):

$$- \log C = a + b E_7^1$$

Dabei ist C die Konzentration, die erforderlich ist, um eine festgesetzte Radiosensibilisierungs-Effektivität zu erhalten, E_7^1 ist das Ein-Elektronen-Reduktionspotential, bestimmt durch Puls-Radiolyse und gemessen bei einem pH-Wert von 7; a und b sind Konstanten.

Die E_7^1 -Werte für einige Nitroimidazole sind in 1.3.2.1, S. 25 aufgelistet.

Sowohl für die Radiosensibilisierungs-Effektivität als auch für die selektive Zytotoxizität wurde die verstärkte Wirksamkeit der 2-Nitroimidazole gegenüber den 5-Nitroimidazolen bestätigt (4, 30).

Die Radiosensibilisierungseigenschaft der Nitroimidazole ist im Gegensatz zur zytotoxischen Wirkung ein temperaturunabhängiger (29, 56, 76), schneller Prozeß, der innerhalb von Millisekunden abläuft, so daß zum Zeitpunkt der Bestrahlung nur sichergestellt sein muß, daß die Verteilung der Imidazole im Gewebe bereits stattgefunden hat (48, 58).

Interessant sind hier die Thesen von Mc Nally und de Ronde (49), welche herausfanden, daß elektronenaffine Radiosensitizer in niedrigen Konzentrationen nur einen Schaden verursachen, der mit der "schnellen Komponente" des Sauerstoff-Effektes korreliert. Sie gingen von den Betrachtungen Shenoy's et al. (68) aus, daß Sauerstoff Zellen nur zu einem Faktor von 1,7 OER (Oxygen-Enhancement-Ratio) sensibilisiert, wenn er 3 - 5 ms vor Bestrahlung verabreicht wird (die sogenannte "schnelle Komponente") wogegen man den vollen Effekt von 2,8 OER nur dann erhält, wenn Sauerstoff mindestens 40 ms vor Bestrahlung anwesend ist.

Mc Nally und de Ronde fanden nun, daß Misonidazol und Sauerstoff, verabreicht in solchen Konzentrationen, die weniger als eine OER von 1,6 ergeben, einen Schaden verursachen, der der "schnellen Komponente" des Sauerstoffs entsprach. Wurden die beiden Substanzen so kombiniert, daß sich für die eine Substanz eine OER von weniger als 1,6 ergibt, für die andere jedoch mehr, so fand sich keine Additivität in der Wirkung (49).

Dafür gibt es zwei Erklärungsansätze (49):

- 1) Durch Bestrahlung werden zwei nicht näher bezeichnete Spezies gebildet und ein Sensitizer kann mit beiden reagieren um zu einem letalen Schaden zu führen, aber eine der beiden hypothetischen Reaktionen kann nur bei relativ hohen Sensitizer-Konzentrationen eingegangen werden.
- 2) Durch Bestrahlung wird nur eine mit O_2 bzw. mit Sensitizern reagierende Verbindung gebildet, welche kurzlebig ist und in eine zweite, länger existierende Verbindung umgewandelt wird, welche immer noch fähig ist, mit Sauerstoff oder Sensitizern zu reagieren; hierzu bedarf es aber höherer Konzentrationen.

1.3.2.3 Nitroimidazole als Chemosensitizer

Ebenso wie hypoxische Zellen resistenter gegenüber der Strahlentherapie sind, ist ihre Sensibilität auch gegenüber einer Reihe von Chemotherapeutika herabgesetzt. Nachgewiesen ist dies beispielsweise für Actinomycin (71), Adriamycin (71), Vincristin (71) und Bleomycin (67, 71).

Der Grund hierfür könnte zum einen darin liegen, daß Bereiche mit hypoxischen Zellen wegen ihrer Entfernung von den Kapillaren für die Chemotherapeutika schlechter zu erreichen sind (62), zum anderen darin, daß hypoxische Zellen längere Zeit in einer Zyklusphase verharren, Chemotherapeutika ihre größte Effektivität jedoch gegenüber rasch proliferierenden Zellen entfalten (79). Außerdem wurde berichtet, daß Hypoxie an sich Zellen gegen die zytotoxische Aktion, z.B. von Bleomycin (67) schützt.

Daraus ergab sich die Frage, ob Nitroimidazole, ähnlich wie in ihrer Wirkung als Radiosensitizer, speziell hypoxische Zellen auch für die Chemotherapie sensibilisieren können.

Inzwischen wurde eine Wirkungsverstärkung durch Nitroimidazole, besonders gegenüber hypoxischen Zellen, für viele Chemotherapeutika aus der Gruppe der alkylierenden Substanzen nachgewiesen, so z.B. für Cyclophosphamid (16, 41, 46, 74, 81, 83), Melphalan (16, 46, 72, 74), CCNU (34, 70, 74, 96) und BCNU (57, 81).

Ebenso wurde für einige andere, nicht alkylierende Verbindungen eine Wirkungsverstärkung in Verbindung mit Nitroimidazolen beschrieben, so z.B. für 5-FU (32, 74, 80), Methothrexat (32, 80), Bleomycin (67), Adriamycin (80) und 6-Mercaptopurin (32).

Einige Autoren führen die Wirkungsverstärkung von Chemotherapeutika auf veränderte Pharmakokinetik zurück. Misonidazol und analoge Verbindungen hemmen jene Enzyme in der Leber, die für den Abbau einer Vielzahl von Chemotherapeutika verantwortlich sind (97). So fand man z.B. eine veränderte Pharmakokinetik im Sinne von erhöhten Plasmaspiegeln von CCNU (42), Cyclophosphamid und Melphalan (33, 74) wenn zuvor Misonidazol in einer einmaligen hohen Dosis verabreicht wurde.

Dies mag mit zur gesteigerten Zytotoxizität beitragen, scheint aber nicht der Hauptmechanismus zu sein, da eine chronische Verabreichung kleiner Misonidazol-Dosen nicht zu einer Veränderung der Pharmakokinetik führt, jedoch, tumorabhängig, zu einer gesteigerten Wirksamkeit, nachgewiesen beispielsweise für Melphalan und Cyclophosphamid (33).

Außerdem wäre eine veränderte Pharmakokinetik keine Erklärung für die Wirkungspräferenz auf hypoxische Zellen (41, 47). Daß Nitroimidazole auch im Zusammenhang mit der Chemotherapie speziell hypoxische Zellen schädigen sei dadurch belegt, daß die Verabreichung von Misonidazol zu keiner Wirkungssteigerung des Chemotherapeutikums, z.B. nachgewiesen für Melphalan, führt, wenn die Zellen zwischen der Misonidazolgabe und der Verabreichung des Chemotherapeutikums mehrere Stunden oxygeniert werden (72).

1.4 Ziele der Untersuchungen

Der Sinn nachstehender Untersuchungen war, nachzuweisen, ob ein zytotoxischer bzw. zytostatischer Effekt von Nitroimidazolen auf in vitro wachsende Lymphoblastenkulturen ausgeübt wird.

Dazu wurden Testserien mit unterschiedlichen Konzentrationen von Azathioprin, 6-Mercaptopurin und drei Imidazolderivaten durchgeführt.

Um einen Einblick in die Imidazolwirkung zu erhalten, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die 6-Mercaptopurin-Wirkung durch Zugabe von Hypoxanthin antagonisiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellen

Als Modell-Zellen dienten permanent wachsende menschliche Lymphoblastenkulturen, die in unserem Labor etabliert wurden.

LS₂-Kultur = undifferenzierte Lymphoblasten

CH₄-Kultur = undifferenzierte Lymphoblasten

2.2 Zellzüchtung

2.2.1 Auftauen der eingefrorenen Zellsuspensionen

Die bei -80° C gelagerten Zellen, die sich in Einmal-Plastikröhrchen befanden, wurden einige Stunden in einem Ständer aufbewahrt, damit sie sich allmählich der Raumtemperatur anpassen konnten. Währenddessen wurde das Nährmedium für die Suspension vorbereitet. Hierzu wurden, wie in allen weiteren Teilungs- und Versuchsansätzen, 80 % Medium und 20 % fetales Kälberserum (FCS), beides in 2.2.2, S. 34 näher beschrieben, verwendet.

Die 4 ml Zellsuspension, enthalten in jedem Plastikröhrchen, wurden vorsichtig aufgeschüttelt und in eine Kulturflasche der Firma Nunclon Delta SI, Nunc 80CMZ/260ML gegeben. Hinzugefügt wurde das o.g. Medium/FCS-Gemisch, bis die 50 ml Marke der verwendeten Kulturflasche erreicht war. Dadurch wurde eine liegende Kultivierung im Brutschrank ermöglicht, da bei diesem Füllungsvolumen das Niveau des Flaschenhalses noch nicht erreicht war.

Jeder der hier genannten Arbeitsschritte wurde an einem sterilen Arbeitsplatz unter sterilen Bedingungen, wie in 2.2.3, S. 37 näher erläutert, ausgeführt.

2.2.2 Nährbedingungen

Als Medium diente RPMI 1640 Medium der Firma Seromed in folgender Zusammensetzung:

Gepufferte Salzlösung	mg/l
NaCl	6000
KCl	400
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	100
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	100
Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	1512
Glucose	2000
NaHCO ₃	2000

Aminosäuren

L-Arginin	200
L-Asparagin	50
L-Asparaginsäure	20
L-Cystin	50
L-Glutaminsäure	20
Glycin	10
L-Histidin	15
L-Hydroxyprolin	20
L-Isoleucin	50
L-Leucin	50
L-Lysin, HCl	40
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	15
L-Prolin	20

L-Serin	30
L-Threonin	20
L-Tryptophan	5
L-Tyrosin	20
L-Valin	20

Vitamine	mg/l
----------	------

p-Aminobenzoessäure	1
Biotin	0,2
D-Ca-Pantothenat	0,25
Cholinchlorid	3
Folsäure	1
L-Inositol	35
Nicotinamid	1
Pyridoxin	1
Riboflavin	0,02
Thiamin HCl	1
Cyanocobalamin	0,005

Andere Bestandteile

Glutathion reduziert	1
Phenolrot	5

Jede 500 ml-Medium-Flasche wurde mit 5 ml Penicillin-Streptomycin (PS) (10.000 I.U./ml Penicillin und 10.000 mcg/ml Streptomycin) sowie 6,8 ml L-Glutamin (L-Glu), 200 mM substituiert. Dazu wurden die in 50 ml-Flaschen tiefgefrorenen Substanzen bei Raumtemperatur aufgetaut. Die nachgenannten Arbeitsgänge erfolgten an einem Arbeitsplatz, der während der Benutzung unter keimfreier Luftumwälzung ("laminar-air-flow") und sonst unter UV-Bestrahlung stand.

Das Einbringen der o.g. Substituenten in die Mediumflasche erfolgte mittels steriler Einmal-Kunststoff-Pipetten bzw. sterilisierter Glaspipetten, die mittels eines Vakuum-Aufsatzes bis zur benötigten Marke aufgezogen wurden. Jegliche Berührung der Pipetten mit den Flaschenhälsen wurde vermieden, nach dem Öffnen und vor dem Schließen der Flaschen wurden trotzdem sowohl Flaschenhälse als auch die mit Stanniol überzogenen Deckel an einem Bunsenbrenner abgeflammt, um mögliche Kontaminationen weitestgehend auszuschalten. Auch der Deckel der fertiggestellten Medium-Flasche wurde mit einem abgeflamten Stanniolquadrat überzogen, die Flasche selbst bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. PS und L-Glu wurden erneut tiefgefroren.

Als zweite Substanz der Nährlösung diente fetales Kälberserum (FCS) der Firma Seromed, Art.Nr. S0112, Mykoplasmen-getestet.

Aufbereitet wurde die 500 ml Originalflasche, indem sie bei 56° C 40 Minuten lang im Wasserbad inaktiviert und anschließend in sterile Glasflaschen zu je 100 ml abgefüllt wurde. Die Gebrauchsflasche wurde bei 4° C aufbewahrt, die restlichen Flaschen bei -20° C gelagert.

Den Zellkulturen wurde jeweils ein Medium/FCS-Gemisch im Verhältnis 5:1 zugesetzt.

Als Wachstumsmilieu für die Kulturflaschen diente ein Brutschrank der Firma Heraeus, Typ KB 500-K-CO₂, eingestellt auf eine Temperatur von 37° C. Die Atmosphäre wurde mit 5 % CO₂ angereichert. Der Brutschrank wurde mit 2 l pro Minute des Luft/CO₂-Gemisches durchströmt. Als Luftbefeuchter dienten zwei in den Brutschrank eingebrachte Glasschalen mit einer Natrium-Azid-Lösung.

2.2.3 Kulturteilung

In früheren Versuchen hatte sich ein 2- bzw. 3-tägiger Teilungsrhythmus für das Wachstum der Zellen als besonders günstig erwiesen. Damit ergaben sich die Teilungstermine Montag, Mittwoch und Freitag.

Geteilt wurde am sterilen Arbeitsplatz. Für jede zu teilende Kulturflasche wurde je eine neue mit Teilungsdatum und -nummer beschriftet, sowie mit Markierungen bei 25 und 50 ml versehen. Entsprechend der erforderlichen Menge, für jede Flasche 25 ml, wurde Medium und FCS im Verhältnis 5:1 in einen sterilen Meßzylinder gegeben. Zur besseren Durchmischung erfolgte ein Umgießen in einen sterilen Meßbecher.

Durch vorsichtiges Schwenken wurde eine homogene Verteilung der Zellen in der zu teilenden Flasche erreicht. Nach Abschrauben der Deckel erfolgte ohne Berührung der Flaschenhalse ein Umgießen von 25 ml der alten in die neue Kulturflasche. Die nun in jeder Flasche vorhandenen 25 ml wurden bis zur 50 ml Marke mit dem Nährgemisch aufgefüllt.

Jedes Hantieren mit Flaschen, Deckeln oder Gefäßen wurde von einem Abflammen im Bunsenbrenner begleitet. Die auf diese Weise angesetzten neuen Kulturen wurden wieder in den Brutschrank gegeben. Um einen Gasaustausch zu gewährleisten wurden die Deckel nur lose aufgesetzt.

Alte unbenötigte Kulturen wurden zur Abtötung der Zellen mit einigen Millilitern 35-37 %iger Formaldehydlösung versetzt und nach 24 Stunden weggeschüttet.

2.2.4 Tiefgefrieren der Zellkulturen

Zum Zwecke der Vorratshaltung erwies es sich als sinnvoll, gut wachsende Zellpopulationen einzufrieren.

Dazu wurde eine Kultur nach einem 48-Stunden-Wachstum in ein 50 ml fassendes steriles Zentrifugenröhrchen umgegossen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 5 Minuten bei 1000 U/min. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen.

Zur Resuspendierung des Zellsedimentes wurde ein 6%iges DMSO-Medium (Dimethylsulfoxid) hergestellt.

Die folgende, für die Tiefgefrierung von 4 Kulturen ausreichende Lösung mag als Beispiel dienen:

16 ml RPMI-Medium und 4 ml FCS wurden mit 1,125 ml DMSO der Firma Merck, Art. 9678, Konzentration 99 %, versetzt und steril filtriert (s. 2.7.5, S.44) Nach Durchmischung wurden jeweils 4 ml des DMSO-Medium-Gemisches abpipettiert und zu einer Zellsuspension gegeben. Nach nochmaliger sorgfältiger Durchmischung erfolgte Umfüllung in sterile 5 ml-Kunststoffröhrchen. Nach einer Lagerung von 30 Minuten im Kühlschrank wurden die Röhrchen bei -80°C eingefroren.

Alle aufgeführten Arbeitsgänge erfolgten unter Beachtung der vorher beschriebenen sterilen Arbeitsweise.

2.3 Zellzählung

Um Aussagen über die Wirkung der im Versuchsansatz zugegebenen Substanzen machen zu können, wurden die Zellen täglich gezählt. Eine zytotoxische Wirkung zeigte sich

als Zunahme der toten Zellen pro μl , eine zytostatische Wirkung war bei fehlender bzw. nur geringer Zellzunahme der Kultur gegeben.

Zur Zählung der Zellen wurde unter sterilen Bedingungen am sterilen Arbeitsplatz etwa 1 ml der Kultur in ein Eppendorf-Gefäß abgefüllt. Von dieser Zellsuspension wurden 50 μl in ein weiteres Eppendorf-Gefäß umpipettiert und dort mit 50 μl des Farbstoffes Trypanblau (0,5 g in 100 ml aqua dest.) versetzt. Da die Membranen von abgestorbenen Zellen für Trypanblau durchlässig sind, kann somit zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Um eine Penetration des Farbstoffes durch geschädigte Zellmembranen zu gewährleisten, erfolgte die Auszählung erst nach 10 Minuten Durchmischungszeit. Ein Tropfen der Zell-Farbstoff-Suspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Zählung erfolgte mittels manuell betriebener mechanischer Zähluhren. Es wurden 4 Eckquadrate mit jeweils 16 Feldern ausgezählt. Die ermittelten Werte wurden mit dem Faktor 5 multipliziert, woraus sich die Lymphoblastenzahlen pro μl ergaben.

2.4 Zellfärbung

Zur Zellfärbung wurden Eppendorf-Gefäße mit etwa 2 ml Zellsuspension gefüllt und in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 12.000 U/min für einige Sekunden kurz anzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen; jeweils 5 μl des Zellsedimentes wurden auf einen Objektträger gebracht und ausgestrichen.

Es schloß sich die Färbung nach Pappenheim an.

Dazu benötigtes Material:

May-Grünwald-Lösung (Merck-Art.-Nr. 1424) unverdünnt
Giemsa Lösung (Merck-Art.-Nr. 9204), 3 ml ad 100 ml
gepuffertes Aqua bidest.

Gepuffertes Aqua bidest., pH 7,2

Ansatz für 1 l: 1,14 g Dinatriumhydrogenphosphat
(Merck-Art.-Nr. 6586) und 0,49 g Kaliumdihydrogen-
phosphat (Merck-Art.-Nr. 4873) wurden dem Aqua bidest.
zugemischt und in einem Kolben mittels Rührkeim gelöst.

Färbevorgang:

Die Objektträger wurden 6 Minuten in eine Glasfärbeschale
mit vorher durchfiltrierter May-Grünwald-Lösung gestellt.
Anschließend wurde die o.g. Pufferlösung zum Abspülen
der Objektträger benutzt, welche dann für 20 Minuten in
eine zweite Glasfärbeschale mit durchfiltrierter ver-
dünnter Giemsalösung gebracht wurden. Nach Beendigung
des Färbevorganges erfolgte die erneute Abspülung mit
gepuffertem Aqua bidest. und die Präparate wurden zum
Trocknen aufgestellt. Die Betrachtung der gefärbten Prä-
parate erfolgte in Öl-Immersion unter dem Lichtmikroskop
der Firma Zeiß, 473011/9901, bei 100-facher Vergrößerung.

2.5 Einstellung der Zellzahlen im Versuchsansatz

Als Ausgangsniveau für die LS_2 -Kultur wurden Zellzahlen
von ca. 1000/ μ l, für die CH_4 -Kultur von ca. 500/ μ l an-
gestrebt.

Dazu wurden zunächst die Zellzahlen in den vorliegenden
Kulturflaschen (Versuchsansatz jeweils montags, also
einer 3-tägigen Anzüchtung entsprechend) bestimmt. Die
Ausrechnung des benötigten Zellsuspensions-Volumens er-
folgte nach folgender Formel:

Vorhandene Zellen pro μl X Volumen (gesucht) entspricht
gewünschter Zellzahl X Volumen (50 ml)

Daraus ergibt sich:

$$\text{Volumen (gesucht)} = \frac{1000 \text{ (bzw. 500)} \times 50 \text{ ml}}{\text{gezählte Zellen}}$$

Dem so errechneten Zellsuspensionsvolumen wurde soviel Medium/FCS-Gemisch, wiederum im Verhältnis 5:1, zugesetzt, daß das Gesamtvolumen in jeder angesetzten Versuchsflasche 50 ml ergab.

Zur Überprüfung der tatsächlich erhaltenen Zellzahlen wurde der Zellgehalt der Kulturflaschen, wie unter 2.3, S. 38 f beschrieben, bestimmt. Diese Zellzahl wurde als Bezugspunkt für die Bewertung des Kulturwachstums verwendet.

2.6 Testsubstanzen

In den Versuchen wurden folgende Testsubstanzen verwendet:

Azathioprin der Firma Wellcome, Molekulargewicht 277,29, Strukturformel s. Abbildung 2, S. 6.

6-Mercaptopurin der Firma Wellcome, Molekulargewicht 152,19, Strukturformel s. Abbildung 3, S. 10.

Hypoxanthin der Firma Merck, Molekulargewicht 136,11, Strukturformel s. Abbildung 7, S. 17

- I_1 = 1-Methyl-5-Chlor-Imidazol*, Molekulargewicht 116,55,
ölige Flüssigkeit
- I_2 = 1-Methyl-4-Nitro-5-Chlor-Imidazol*, Molekulargewicht
161,55, kristallin
- I_3 = 1-Methyl-4-Nitro-5-Thio-Imidazol*, Molekulargewicht
159,17, kristallin

Die Strukturformeln der drei Imidazolderivate sind in
Abbildung 11 dargestellt

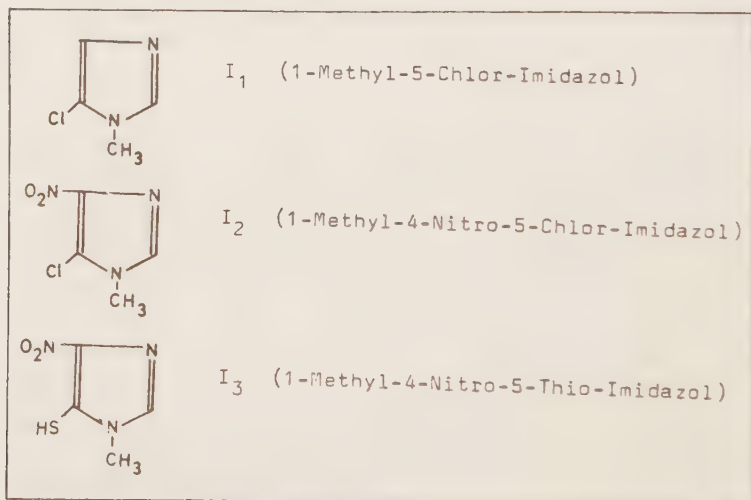


Abbildung 11 Strukturformeln der in den Versuchen ver-
wendeten Imidazolderivate.

* Die drei Imidazolderivate wurden synthetisiert und ge-
reinigt von Dr. H.J. Zeitler, Abt. für klinische Häma-
tologie des Inst. für Hämatologie der Gesellschaft für
Strahlen- und Umweltforschung mbH, München. Ihm soll
an dieser Stelle für die Überlassung der Präparationen
gedankt werden.

2.7 Herstellung der Testlösungen

2.7.1 Herstellung des Lösungsmittels

Zur Herstellung eines 0,05 M Kaliumbicarbonates wurden 0,5 g KHCO_3 (Merck-Art.-Nr. 4854) in 100 ml Aqua bidest. gelöst. Die Aufbewahrung dieses Lösungsmittels erfolgte bei 4° C im Kühlschrank.

2.7.2 Auswiegen der festen Substanzen

Die Auswägung der Substanzen erfolgte auf der Analysenwaage Mettler, H54AR/9, BJ 77, Max = 160 g, d = 0,01 mg.

Damit die erwünschte Endkonzentration in der Versuchsflasche erreicht wurde, mußten die Verdünnungseffekte durch das Lösungsmittel und durch das Volumen der Versuchssuspension berücksichtigt werden. Dies sei anhand eines Beispiels erklärt:

In der Versuchsflasche wird eine Konzentration von 10^{-6} M gewünscht. Die Substanz wird entsprechend einer Konzentration von 3×10^{-4} M ausgewogen. Nach Zugabe von 3 ml Lösungsmittel bleibt eine Konzentration von 10^{-4} M. Davon erfolgt der Zusatz von 0,5 ml in die 50 ml-Kulturflasche, wodurch sich ein Verdünnungseffekt um den Faktor 100 ergibt. Damit ist die gewünschte Endkonzentration von 10^{-6} M erreicht.

Zur Eliminierung der Eigengewichte der als Wäagebehälter dienenden Eppendorf-Gefäße wurde der 0-Punkt der Waage auf deren Leergewicht austariert. Wegen minimaler Gewichts differenzen hatte dies für jedes verwendete Eppendorf-Gefäß erneut zu erfolgen.

2.7.3 Pipettieren der flüssigen Substanz

Das flüssig vorliegende Imidazolpräparat I₁ mußte mit einer Hamilton-Bonaduz, Mikroliter Syringe-Pipette entsprechend der gewünschten Molarität aufgezogen werden.

2.7.4 Auflösen der Substanzen im Lösungsmittel

Jedem Eppendorf-Gefäß mit der ausgewogenen Substanz wurde zunächst 1 ml KHCO_3 zugesetzt und der Inhalt in ein 5 ml Kunststoffröhrchen umpipettiert. Zur Vermeidung von Rückständen wurde das Eppendorf-Gefäß zwei weitere Male mit jeweils 1 ml KHCO_3 gespült, der Inhalt anschließend ebenfalls umpipettiert. Die Lösungsmittelmenge von 3 ml wurde gewählt, um nach Volumenverlusten durch die Filtration von etwa 1 ml mit etwa 2 ml noch eine ausreichende Menge Substanz-Lösung zu haben, um eventuelle Wechselwirkungen der gelösten Substanz mit den Wänden der Plastikröhrchen möglichst klein zu halten.

Zu der sich in 3 ml KHCO_3 befindlichen Substanz wurden 50 μl 1 N NaOH zugegeben, da aus früheren Versuchen bekannt war, daß ein basischer pH die Löslichkeit der Substanzen verbessert. Da sich einige Substanzen, insbesondere Azathioprin, als schwer löslich erwiesen, wurden die Plastikröhrchen ca. 10 Minuten bei 37° C im Wasserbad gehalten. Zwischenzeitlich erfolgte mehrmals eine Durchmischung auf dem Rüttler.

2.7.5 Sterile Filtration

Jede in 3 ml $\text{KHCO}_3/\text{NaOH}$ gelöste Substanz mußte vor ihrer weiteren Verwendung steril filtriert werden. Sterile Filter der Firma Millipore, Miltex-GS, kamen zur Anwendung.

Mittels einer Eppendorf-Pipette wurde der Inhalt der Plastikröhrchen in eine 5 ml fassende sterile Einwegspritze eingebracht. Die Spritze selbst wurde dem noch in der Verpackung befindlichen sterilen Filter aufgesetzt, um diesen ohne Zuhilfenahme der Hände entnehmen zu können. Die Filtration erfolgte in sterile, kurz zuvor der Verpackung entnommene Plastikröhrchen. Im Filter blieb ein Rückstand von mindestens 1 ml Lösungsmittel.

2.8 Pipettieren der Substanzen in die Kulturflaschen

Den Eppendorf-Pipetten wurden einzeln verpackte sterile Spitzen aufgesetzt und damit je 0,5 ml der steril filtrierten Substanz-Lösungen aufgezogen. Die Kulturflaschen wurden geöffnet und abgeflammt. Der Substanzzusatz erfolgte ohne Berührung des Flaschenhalses. Anschließend wurden die Kulturflaschen wiederum abgeflammt, verschlossen, mittels vorsichtigem Schwenken durchmischt und in den Brutschrank gelegt. Eine Probenentnahme erfolgte täglich, eine Teilung der Versuchskulturen wurde für die Dauer des Versuches (Montag bis einschließlich Freitag) nicht durchgeführt.

2.9 Verwendetes Arbeitsmaterial

2.9.1 Sterile Gefäße

Die Sterilisation der verwendeten Bechergläser und Meßzylinder erfolgte in unserem Labor in einem Autoklaven der Firma M. Ehrent GmbH, Typ TK 2, Nr. 6942. Dazu wurden die Öffnungen der gewaschenen und getrockneten Gefäße mit Stanniolpapier verschlossen, wobei darauf zu achten war, daß insbesondere an den Rändern bzw. Ausgüssen keine Falten entstanden. Sterilisiert wurde für die Dauer

von 12 Stunden bei 210° C. Eine Öffnung der Gefäße erfolgte nur am sterilen Arbeitsplatz, unmittelbar vor Gebrauch.

2.9.2 Sterile Pipettenspitzen und Eppendorf-Gefäße

Zur Sterilisation wurden Pipettenspitzen und Eppendorf-Gefäße in Stericlin-Gas-Papierhüllen eingebracht, die Ränder beidseitig verschweißt und bei 120° C für 45 Minuten dampfsterilisiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Normales Wachstumsverhalten der Lymphoblasten-Kulturen LS₂ und CH₄

Abbildung 12 stellt den über 26 Wochen gemittelten Wachstumsverlauf der LS₂-Population dar, aufgegliedert in Gesamtzellen, lebende Zellen und tote Zellen. Eingetragen sind dazu die einfachen Standardabweichungen.

Die Zellkulturen wurden zum Zeitpunkt 0 auf einen Wert von etwa 1000 Zellen eingestellt. Dieser Wert war jedoch nur annäherungsweise zu erhalten (ca. 800 bis 1500). Bei Betrachtung der 72-Stunden-Werte kann man jedoch die Schwankungen der Ausgangswerte vernachlässigen. Dazu zeigt Abbildung 13 ein Beispiel, in der der Wachstumsverlauf der Kultur mit den niedrigsten Ausgangswerten derjenigen mit den höchsten Werten gegenübergestellt wird.

Die Standardabweichungen zeigen eine relativ gleichmäßige Zunahme bis zum Zeitpunkt nach 72 Stunden. Das erklärt sich daraus, daß, abhängig vom verwendeten Medium, FCS sowie der Brutschrankbedingungen, Zeiten überschießenden Wachstums mit solchen abwechselten, in denen nur geringe Zellzahlen erreicht werden konnten.

Die hohen Abweichungen der lebenden und toten Zellen nach 96 Stunden sind dadurch bedingt, daß die Absterbephase um diesen Zeitpunkt liegt. Bei sehr günstigen Wachstumsbedingungen kann die Zahl der toten Zellen noch recht klein sein, bei geringfügig schlechteren Bedingungen sind schon kaum mehr lebende Zellen zu finden, so daß die 96-Stunden-Werte untereinander nicht mehr vergleichbar sind.

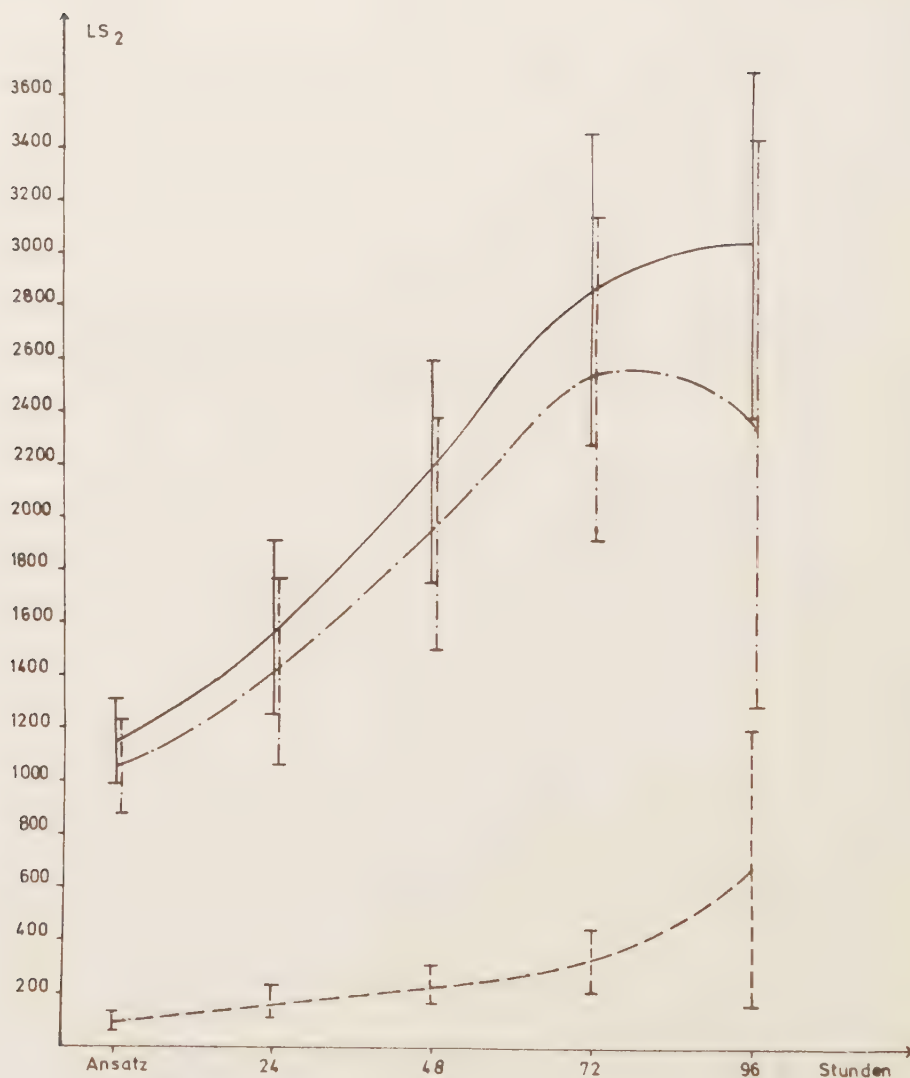


Abbildung 12 *LS₂*-Wachstumsverhalten, gemittelt über 26 Wochen. Aufgetragen ist auch die einfache Standardabweichung ($\pm s$) für die Gesamtzellen (durchgezogene Linien), die lebenden Zellen (Strichpunktlinien) und die toten Zellen (gestrichelte Linien).

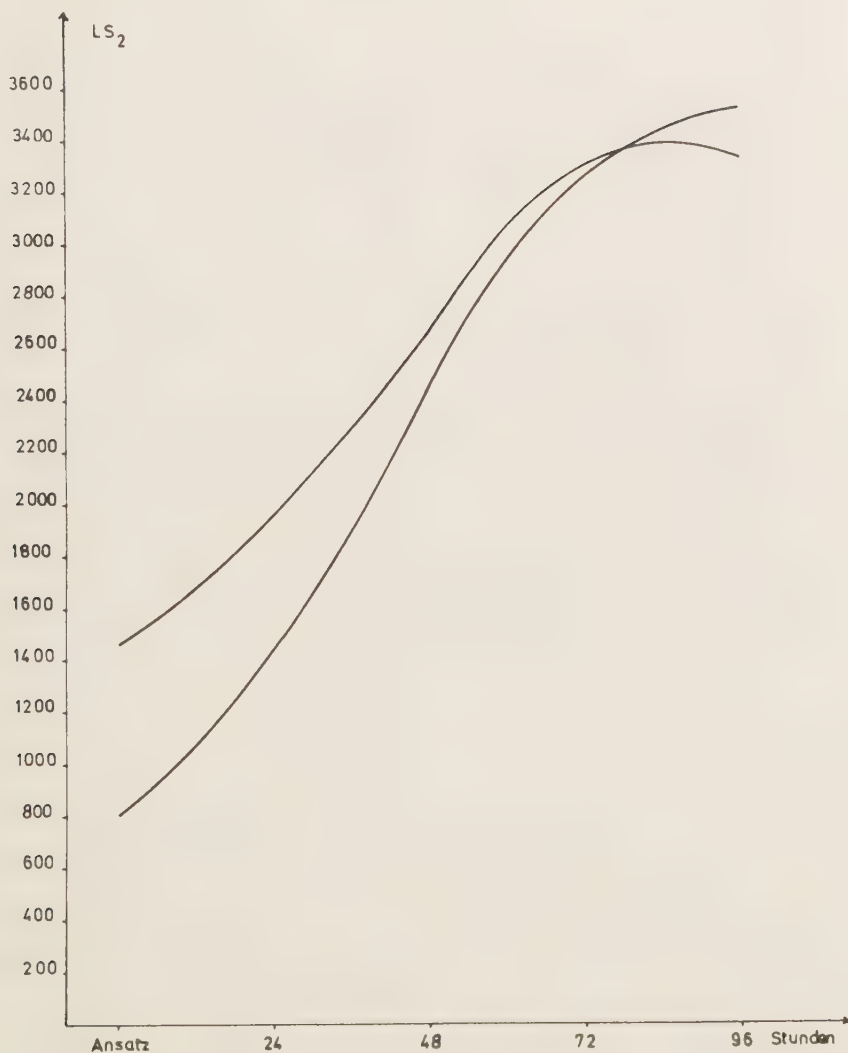


Abbildung 13 Wachstumsverhalten der LS_2 -Population bei unterschiedlichen Ausgangswerten. Gegenübergestellt wird der Wachstumsverlauf der Kultur mit den niedrigsten Ausgangswerten derjenigen mit den höchsten Werten. Dargestellt sind die Gesamtzellen.

So erweisen sich zur Bewertung des gesamten Kulturwachstums die 72-Stunden-Werte als die geeignetsten, da zu diesem Zeitpunkt, wie oben erwähnt, Schwankungen der Ausgangszellzahlen bereinigt sind und der Kurvenverlauf konstant am Ende der log-Phase liegt.

Abbildung 14 zeigt den Wachstumsverlauf der CH_4 -Population, gemittelt über 18 Wochen. Die CH_4 -Kulturen wurden zum Zeitpunkt 0 auf rund 500 Zellen eingestellt. Ihr Wachstumsverlauf unterscheidet sich von den LS_2 -Kulturen durch eine ausgeprägtere lag-Phase. Das bedeutet, daß die im Vergleich zu den LS_2 -Zellen etwas empfindlicheren CH_4 -Zellen längere Zeit brauchen, um sich an das neue Milieu zu gewöhnen. Das Wachstum beginnt erst nach 24 Stunden, die Standardabweichungen der lebenden und toten Zellen nach 96 Stunden haben demzufolge noch nicht so stark zugenommen wie bei den LS_2 -Zellen. Ansonsten gilt hier analog das für die LS_2 -Kulturen Beschriebene.

Zellen/mm³

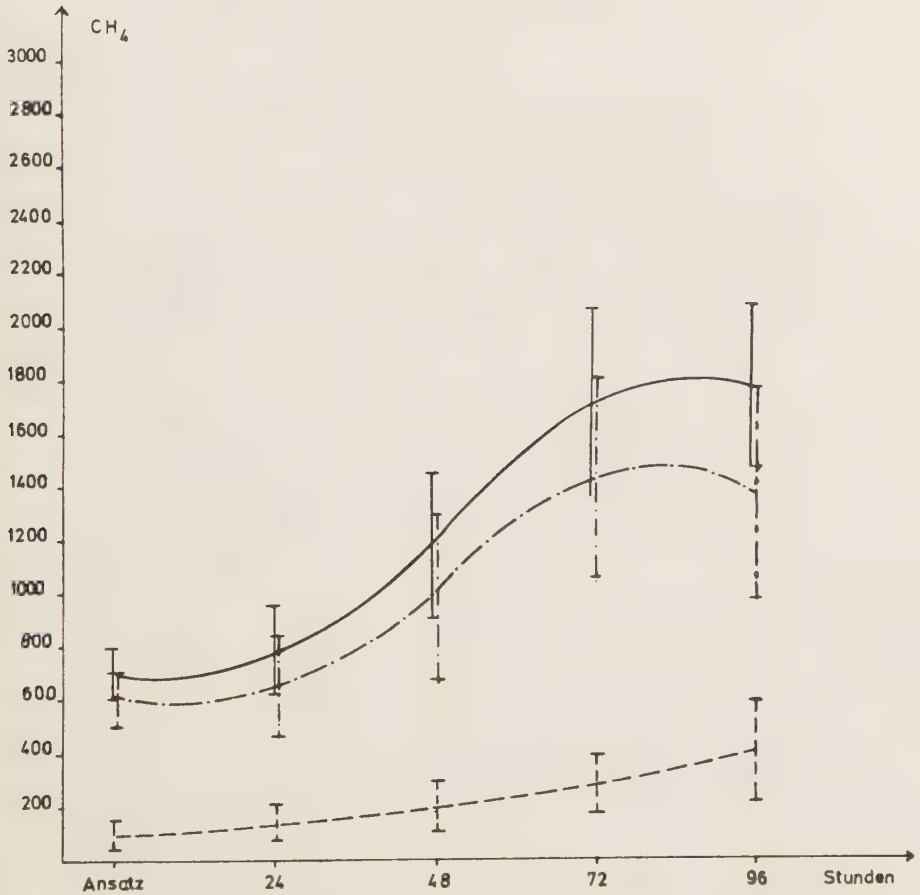


Abbildung 14 CH_4 -Wachstumsverhalten, gemittelt über 18 Wochen. Aufgetragen ist die einfache Standardabweichung ($\pm s$) für die Gesamtzellen (durchgezogene Linien), die lebenden Zellen (Strichpunktlinien) und die toten Zellen (gestrichelte Linien).

3.2 Wachstumsverlauf unter der Einwirkung der Testsubstanzen

3.2.1 Mögliche Effekte der Testsubstanzen auf das Kulturwachstum

Je nach Art und Konzentration der zugegebenen Substanz kam es zu folgenden Effekten:

Ungehindertes Zellwachstum

Die erreichten Zellzahlen wiesen keinen signifikanten Unterschied zu entsprechenden Kontrollkulturen auf, denen keine Testsubstanzen zugesetzt wurden.

Zytostatischer Effekt

Das Zellwachstum sistierte, die erreichten Zellzahlen lagen deutlich unter den in Kontrollkulturen erreichten; eine Auswirkung auf die Anzahl der toten Zellen war nicht nachweisbar.

Zytotoxischer Effekt

Die Anzahl der toten Zellen war gestiegen.

Bei entsprechender Substanzwirkung wurde sowohl der zytostatische als auch der zytotoxische Effekt deutlich.

3.2.2 Methode der Ergebnis-Darstellung

In der weiteren Darstellung werden wegen der besseren Übersichtlichkeit Schaubilder gegenübergestellt, denen die 72-Stunden-Werte zugrundeliegen. Um die Wachstumschwankungen, die, wie auf Seite 47 schon angedeutet, auf unterschiedlicher Medium- und FCS-Zusammensetzung, Temperatur- und Brutschrankbedingungen und wahrscheinlich auch noch weiteren unbekannten Störvariablen beruhen, weitestgehend zu eliminieren, werden die Ergebnisse jeweils in Bezug zu einer Kontrolle gesetzt, die über den jeweiligen Zeitraum denselben Bedingungen ausgesetzt war.

Abbildung 15 zeigt als Beispiel den Wachstumsverlauf einer durch 6-Mercaptopurin in einer Konzentration von 10^{-5} M gehemmten Kultur im Vergleich zur Kontrollkultur. Die relevanten Werte daraus werden in Abbildung 16 in die Form eines Schaubildes übertragen, welches als Darstellungsgrundlage der im folgenden aufgeführten Ergebnisse dient.

Auf der Ordinate sind nach oben relative Gesamtzellzahlen aufgetragen, die sich auf den jeweiligen 72-Stunden-Gesamtzellwert der Kontrollkurve beziehen, im folgenden kurz GZ(K) bezeichnet.

Beispiel:

72 Stunden nach dem Ansatz befanden sich in der Flasche mit der Kontrollkultur 3080 Zellen/ μ l, zusammengesetzt aus 2785 lebenden und 295 toten Zellen/ μ l. Diese 3080 Zellen der Kontrolle werden im Schaubild gleich 1 gesetzt (linke leere Säule in der Abbildung 16), womit ein einfaches Vergleichen der relevanten 72-Stundenwerte ermöglicht werden soll. Der 72-Stunden-Gesamtwert

der durch 6-Mercaptopurin gehemmten Kultur betrug 1938 Zellen/ μ l, dies entspricht 63 % von 3080 Zellen, bzw. einem GZ(K) von 0,63 (rechte leere Säule in Abbildung 16).

Angesetzt wurde die Kontrollkultur mit 1143 Gesamtzellen/ μ l, die 6-Mercaptopurin-Kultur mit 1133 Zellen/ μ l, was 37,11 % bzw. 36,79 % der o.g. 3080 Zellen entspricht, im Schaubild je als 0,37 GZ(K) dargestellt (längsgestreifte Säulen in Abbildung 16). Diese Ansatzwerte sollen die Beurteilung des effektiven Wachstums mit einem Blick ermöglichen.

Geringe Schwankungen der GZ(K)-Werte um die Bezugsgröße 1 herum sind aus den in 3.1, Seite 47 genannten Gründen zu vernachlässigen.

Nach unten aufgetragen ist in der Abbildung 16 der prozentuale Anteil der toten Zellen (schraffierte Säulen), der jedoch nicht mehr auf die Kontrolle sondern auf die einzelnen Kulturen mit den entsprechenden Substanzen bezogen ist, im weiteren TZ(S) genannt.

Beispiel:

Von den 3080 Kontroll-Gesamtzellen/ μ l nach 72 Stunden waren 295 Zellen/ μ l tot, was einem Prozentsatz von 9,6 entspricht. Die 1143 Ansatz-Gesamtzellen/ μ l am Kulturbeginn enthielten 138 tote Zellen/ μ l, woraus sich ein Prozentsatz von 12,0 ergibt. Die 6-Mercaptopurin-Wirkung findet auch in einem hohen Anteil von toten Zellen Ausdruck: Nach 72 Stunden sind 1123 der 1938 vorhandenen Zellen/ μ l tot, was 57,9 % ausmacht.

Zellen/mm³

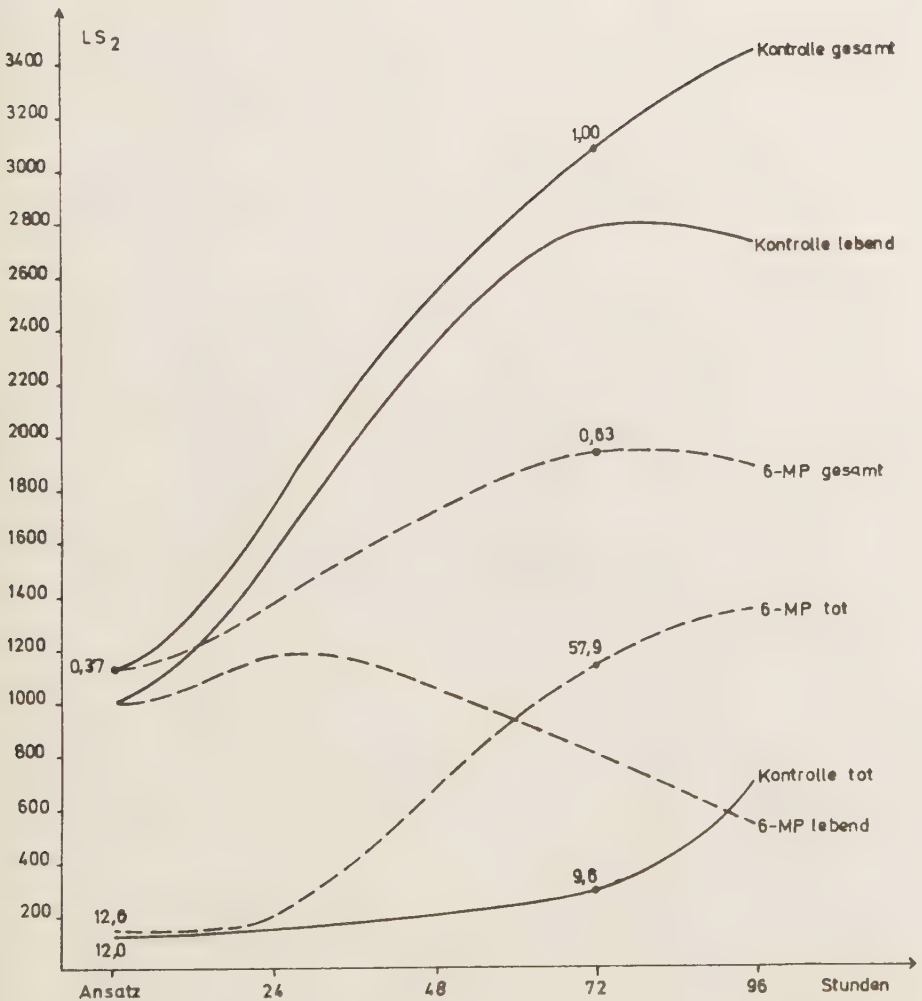


Abbildung 15 Aufgetragen sind Gesamtzellen, lebende Zellen und tote Zellen einer LS₂-Kontrollkultur (durchgezogene Linien) sowie einer durch 6-MP in einer Konzentration von 10⁻⁵ M in ihrem Wachstum gehemmten LS₂-Kultur (gestrichelte Linien). Die eingetragenen Zahlen entsprechen den GZ(K)- bzw. TZ(S)-Werten, die für dieses Beispiel in Abbildung 16 dargestellt werden.

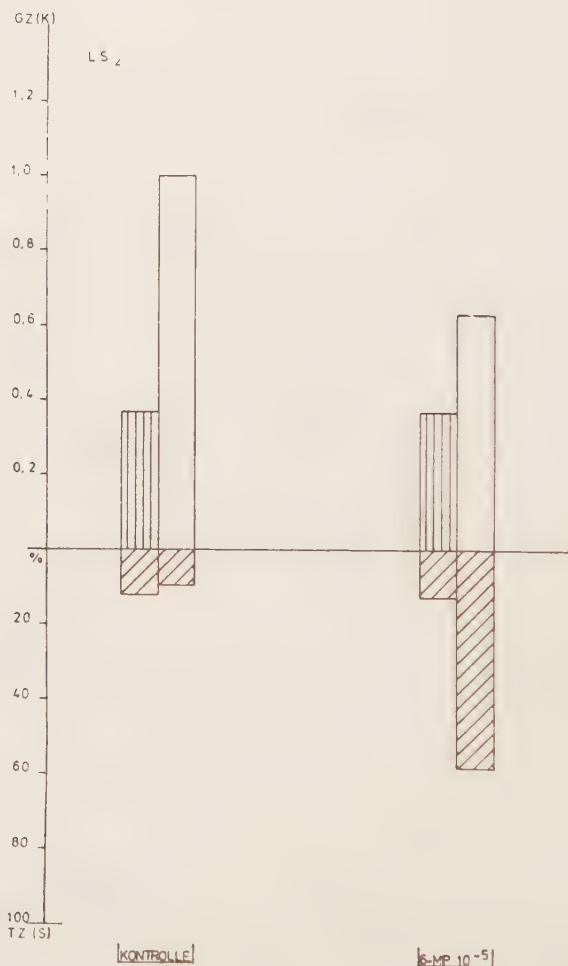


Abbildung 16 Darstellung der relevanten Werte aus Abbildung 15 in Form eines Schaubildes. Erläuterungen dazu finden sich in 3.2.2, Seite 53 f.

-  relative Gesamtzellzahl nach 72-Stunden Wachstum
-  relative Gesamtzellzahl bei Versuchsansatz
-  prozentualer Anteil der toten Zellen

3.2.3 Auswirkungen des Lösungsmittels auf das Zellwachstum

Als Substanz-Lösungsmittel wurden 3 ml 0,05 M KHCO_3 unter Zusatz von 50 μl 1 N NaOH verwendet. Davon wurde jeder Flasche 0,5 ml zugesetzt (s.2.7.4, S. 44).

In einer Testreihe, die bei den LS_2 -Zellen über 10 Wochen, bei den CH_4 -Zellen über 9 Wochen lief, wurden die Kulturen, denen Lösungsmittel zugesetzt wurde, den Kontrollkulturen ohne Lösungsmittelzusatz gegenübergestellt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 17 dargestellt.

Bei den LS_2 -Zellen zeigt sich bei gleichen Ausgangswerten ein annähernd gleiches Wachstumsverhalten. Der Anteil der toten Zellen liegt bei den mit Lösungsmittel versetzten Kulturen sogar geringfügig niedriger als bei den Kontrollen.

Bei den CH_4 -Zellen wird in den Kulturen mit Lösungsmittelzusatz sogar ein gegenüber der Kontrolle erhöhtes Wachstumsverhalten erreicht, das allerdings im Bereich der üblichen Schwankungsbreite liegt. Auch hier liegt der Prozentsatz der toten Zellen unwesentlich unter dem der Kontrollkulturen.

Wie die Gegenüberstellung zeigt, ist eine Auswirkung des Lösungsmittels sowohl im Sinne einer Zellwachstums-Hemmung als auch im Sinne einer Begünstigung des Wachstums nicht anzunehmen.

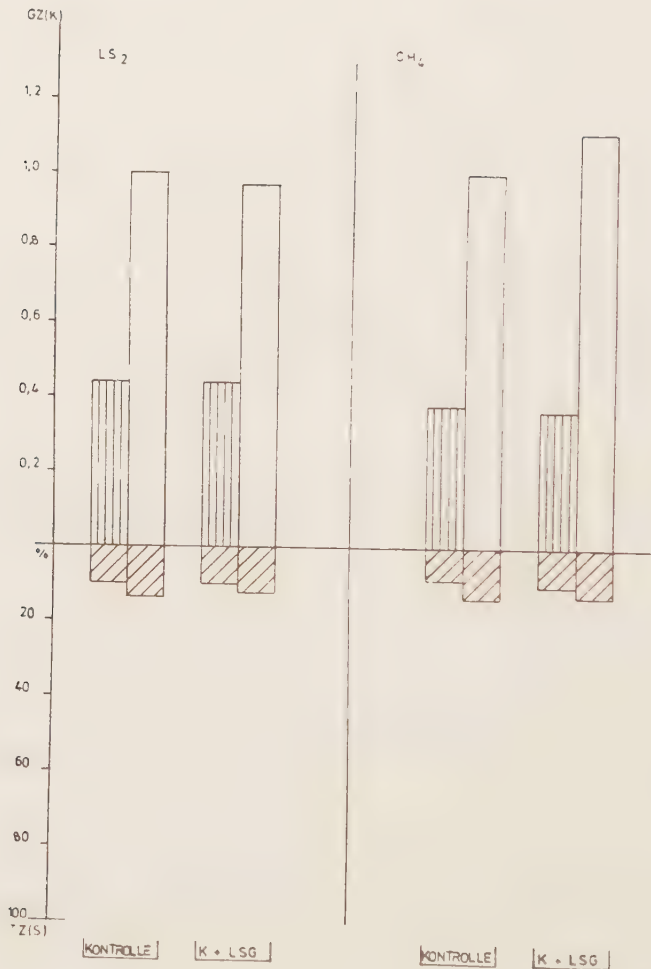


Abbildung 17 In der linken Bildhälfte werden LS₂-Kontrollkulturen solchen Kulturen gegenübergestellt, denen Lösungsmittel (K + LSG) zugesetzt wurde (n = 10). Die rechte Bildhälfte zeigt entsprechendes für die CH₄-Kulturen (n = 9). (Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

3.2.4 Zellwachstum nach Zugabe der Substanzen in einer Konzentration von 10^{-6} M

Getestet wurden die Substanzen Azathioprin, 6-Mercaptopurin und die Imidazolderivate I_1 , I_2 und I_3 .

Abbildung 18 zeigt das Verhalten der LS_2 -Kulturen, Abbildung 19 das der CH_4 -Kulturen.

Eine Wirkung von Azathioprin ist bei dieser Konzentration noch nicht feststellbar.

Eine sichere 6-Mercaptopurin-Wirkung kann bei dieser Konzentration ebenfalls nicht angenommen werden. Zwar erreichen die Kulturen unter 6-Mercaptopurin-Einwirkung nicht die Zellzahlen der Kontrollkulturen; die Abweichung liegt jedoch noch im Rahmen der üblichen Schwankungsbreite.

Die drei Imidazolderivate zeigen in der Konzentration von 10^{-6} M keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Kulturen.

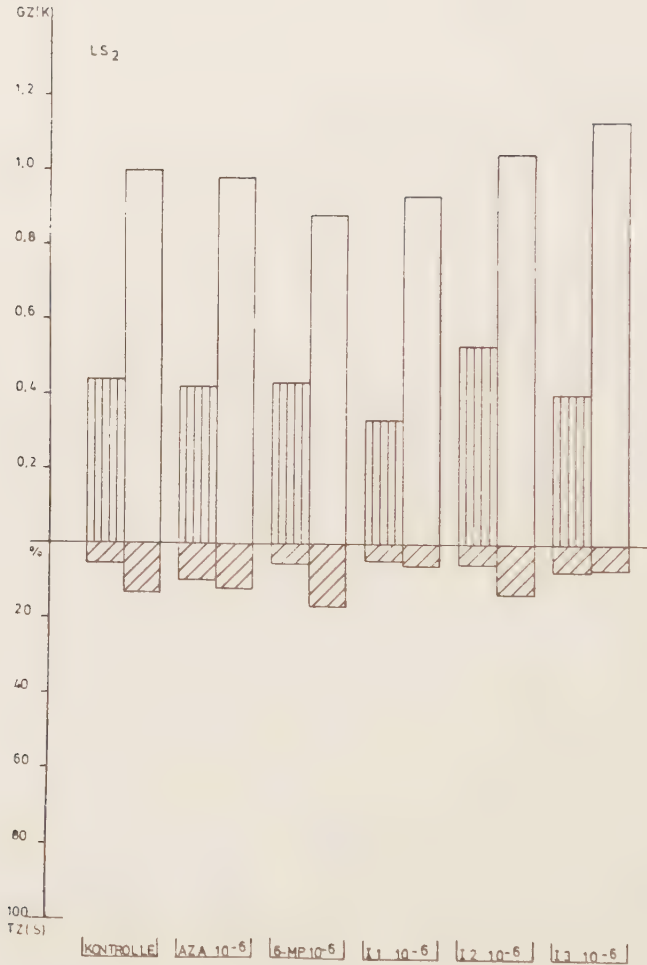


Abbildung 18 Wachstumsverhalten der LS₂-Kulturen unter Einwirkung der Testsubstanzen (10⁻⁶ M). (Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

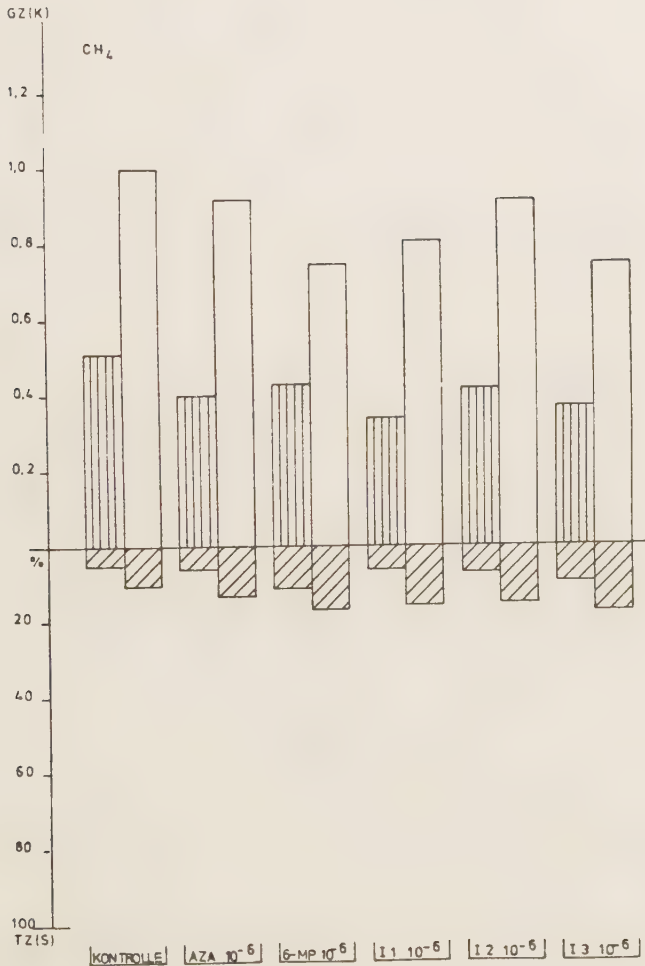


Abbildung 19 Wachstumsverhalten der CH₄-Kulturen unter Einwirkung der Testsubstanzen (10⁻⁶ M).
(Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

3.2.5 Zellwachstum nach Zugabe der Substanzen in einer Konzentration von 10^{-5} M

In Abbildung 20 sind die LS_2 -Kulturen, in Abbildung 21 die CH_4 -Kulturen dargestellt.

Bei dieser Konzentration wird eine Azathioprin-Wirkung deutlich. Bei beiden Kulturen ist sowohl eine Wachstums-
hemmung als auch eine gegenüber der Kontrolle höhere Toten-Rate feststellbar.

6-Mercaptopurin zeigt einen ausgeprägten suppressiven Effekt. Das Wachstum erreicht nur Zellzahlen, die knapp über der Hälfte der entsprechenden Kontrollen liegen. Der Totenanteil ist deutlich erhöht, bei den LS_2 -Kulturen übersteigt er sogar den Anteil der lebenden Zellen.

Allen drei Imidazolderivaten kann keine sichere Wirkung zugeschrieben werden. Sowohl das Wachstum als auch der Prozentsatz der toten Zellen liegen ungefähr im Bereich der entsprechenden Kontrollen.

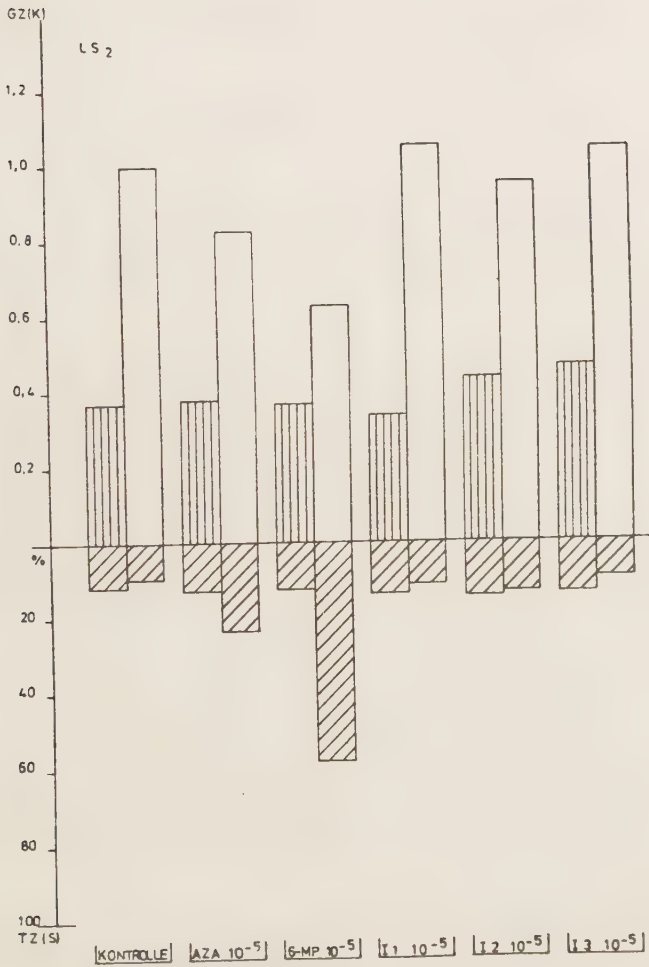


Abbildung 20 Wachstumsverhalten der LS₂-Kulturen unter Einwirkung der Testsubstanzen (10⁻⁵ M).
(Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

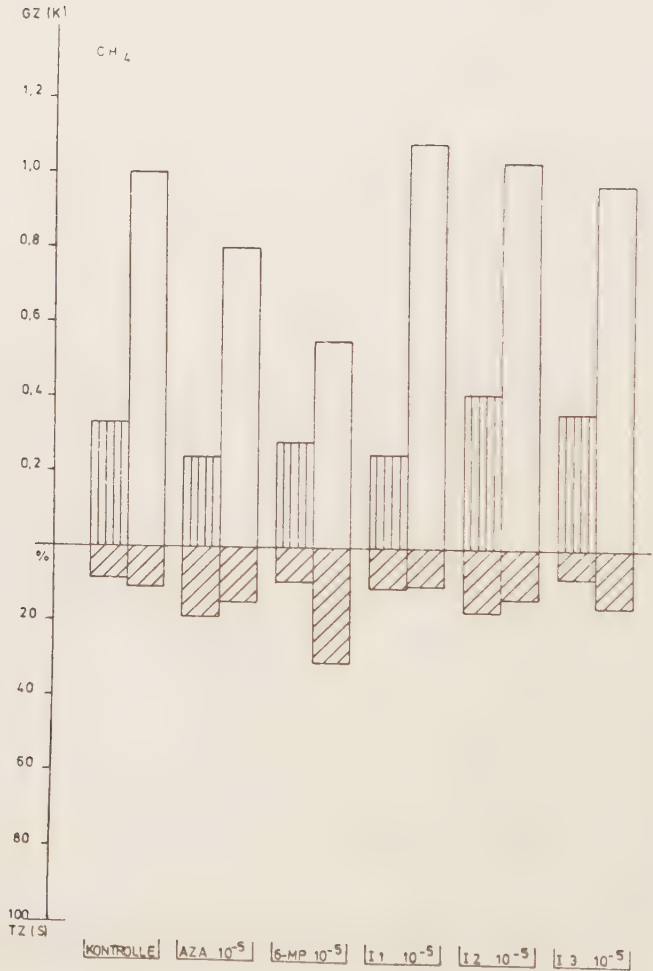


Abbildung 21 Wachstumsverhalten der CH₄-Kulturen unter Einwirkung der Testsubstanzen (10⁻⁵ M). (Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

3.2.6 Zellwachstum nach Zugabe der Substanzen in einer Konzentration von 10^{-4} M

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse mit LS_2 -Kulturen, Abbildung 23 die mit CH_4 -Kulturen.

Bei dieser hohen Konzentration ist die Azathioprin-Wirkung sehr ausgeprägt. Die Gesamtzellen erreichen nur etwa 50 % der Kontrollen; weit über die Hälfte der Zellen sind tot.

Der zytotoxische Effekt von 6-Mercaptopurin ist bei dieser Konzentration mit 49 % (LS_2 -Kulturen) bzw. 28 % (CH_4 -Kulturen) an toten Zellen deutlich geringer als der von Azathioprin. Ein Kulturwachstum findet unter der Wirkung von 10^{-4} M 6-Mercaptopurin bis 67 % (LS_2 -Kulturen) bzw. 51 % (CH_4 -Kulturen) der entsprechenden Kontrollwerte statt.

Betrachtet man hierzu die Wirkung von 10^{-5} M 6-Mercaptopurin mit einem Anteil der toten Zellen von 58 % (LS_2 -Kulturen, s. Abb. 20, S. 63) bzw. 31 % (CH_4 -Kulturen, s. Abb. 21, S. 64) und einem Kulturwachstum von 63 % (LS_2 -Kulturen) bzw. 55 % (CH_4 -Kulturen), so sieht man, daß die Konzentrationserhöhung der Substanz von 10^{-5} M auf 10^{-4} M keine wesentliche Wirkungssteigerung bedingen konnte.

Das I_2 -Derivat, bei dem bei der Konzentration von 10^{-5} M noch keinerlei Wirkung feststellbar war, zeigt nun die stärkste Zytotoxizität. Die Zellzahlen nach 72 Stunden liegen im selben Bereich wie zum Ansatzzeitpunkt, die LS_2 -Zellen sind zu 83 % tot, bei dem empfindlicheren CH_4 -Zellen sind ausschließlich tote Zellen zu finden.

Eine Wirkung von I_1 und I_3 kann nicht festgestellt werden.

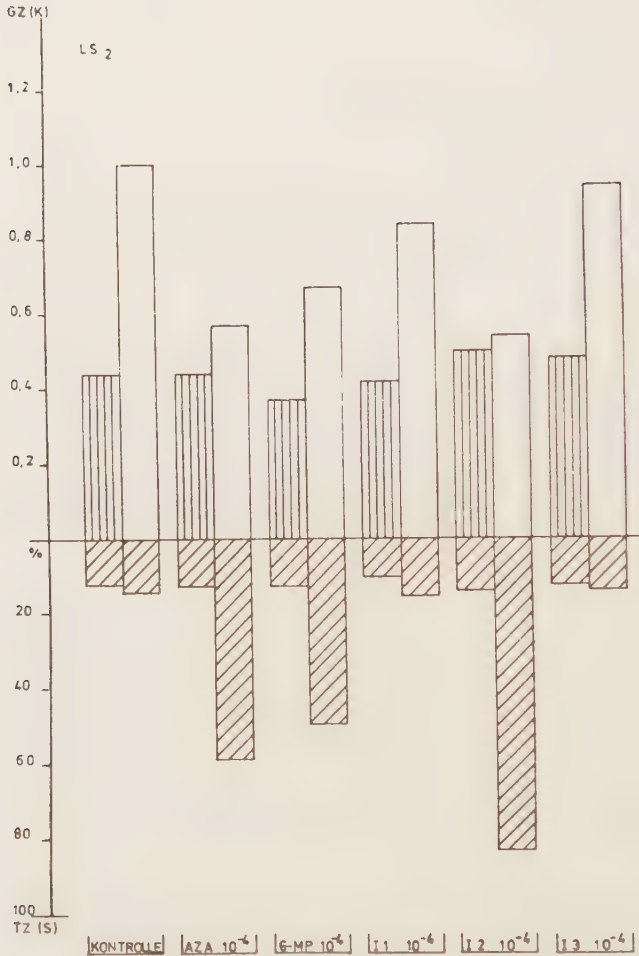


Abbildung 22 Wachstumsverhalten der LS₂-Kulturen unter Einwirkung der Testsubstanzen (10⁻⁴ M). (Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

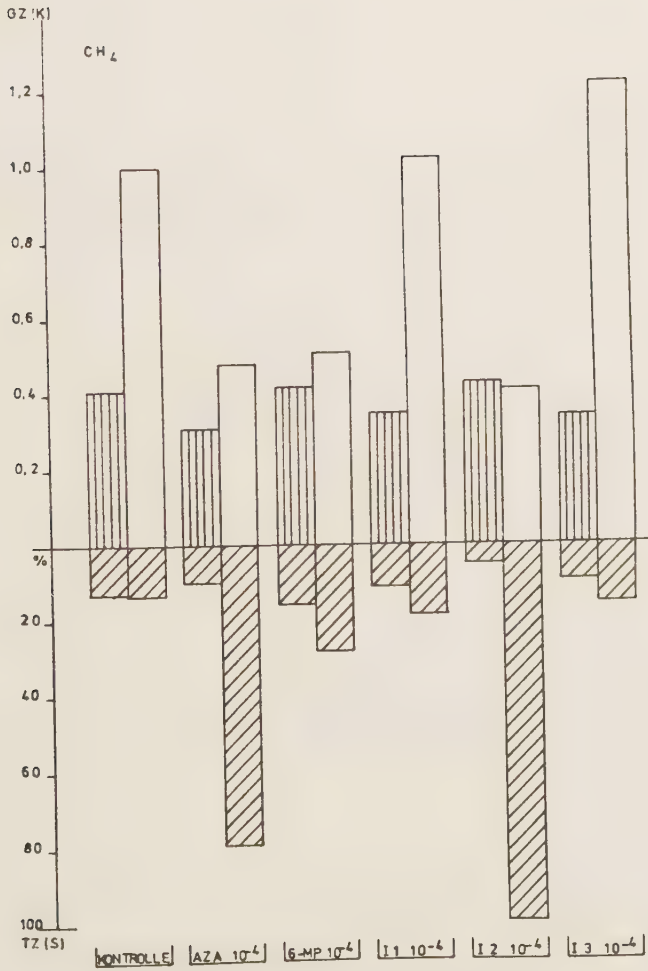


Abbildung 23 Wachstumsverhalten der CH₄-Kulturen unter Einwirkung der Testsubstanzen (10⁻⁴ M). (Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

3.2.7 I₂-Verdünnungsreihe

Da, wie aus Abbildung 20, S. 63 und Abbildung 21, S. 64 hervorgeht, das I₂-Derivat in einer Konzentration von 10⁻⁵ M noch keinerlei Wirkung zeigte, bei der Konzentration von 10⁻⁴ M jedoch eine ausgeprägte Kulturwachstumshemmung mit einer fast 100 %igen Zytotoxizität entwickelte, wurde in einer Verdünnungsreihe ermittelt, bei welcher Konzentration der Wirkungsbeginn liegt.

Die Ergebnisse für die LS₂-Kulturen sind in Abbildung 24, die für die CH₄-Kulturen in Abbildung 25 dargestellt. Um eine genauere Verlaufsbeobachtung zu ermöglichen, sind zwischen Anfangs- und 72-Stunden-Werten auch die Werte nach 24 und nach 48 Stunden eingesetzt.

Der bei den LS₂-Zellen bei einer Konzentration von 2 x 10⁻⁵ M festzustellende depressive Effekt (GZ(K) = 0,71) ist wahrscheinlich eine zufällige Abweichung, denn der Toten-Anteil liegt noch im normalen Rahmen, die Ansatz-Zellzahlen lagen sehr niedrig (GZ(K) = 0,39) und der Effekt ist bei der nächsthöheren Konzentration wieder aufgehoben. Außerdem wurde der Verdünnungsreihen-Versuch nur einmal durchgeführt, so daß Differenzen eher vorge-täuscht werden können.

Bei der Konzentration von 6 x 10⁻⁵ M ist bei den LS₂-Kulturen bereits eine Wachstumshemmung festzustellen, die Toten-Zahlen liegen hier aber noch nicht wesentlich über dem Normbereich. Der eigentliche Wirkungsbeginn wird bei einer Konzentration von 8 x 10⁻⁵ M erreicht. Ab hier ist ein völliges Sistieren des Wachstums zu sehen und außerdem im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen eine starke Zunahme des Toten-Prozentsatzes festzustellen.

Bei den CH_4 -Zellen ist der bei einer Konzentration von 10^{-5} M erreichte Wachstumsschub wieder als zufällig aus der Reihe fallendes Ergebnis zu betrachten.

Bei den CH_4 -Zellen, die allgemein etwas vulnerabler sind als die tS_2 -Zellen, kann der Wirkungsbeginn schon bei einer Konzentration von 6×10^{-5} M angenommen werden, da hier das Wachstum bereits deutlich eingeschränkt ist und der Toten-Anteil annähernd 50 % erreicht.

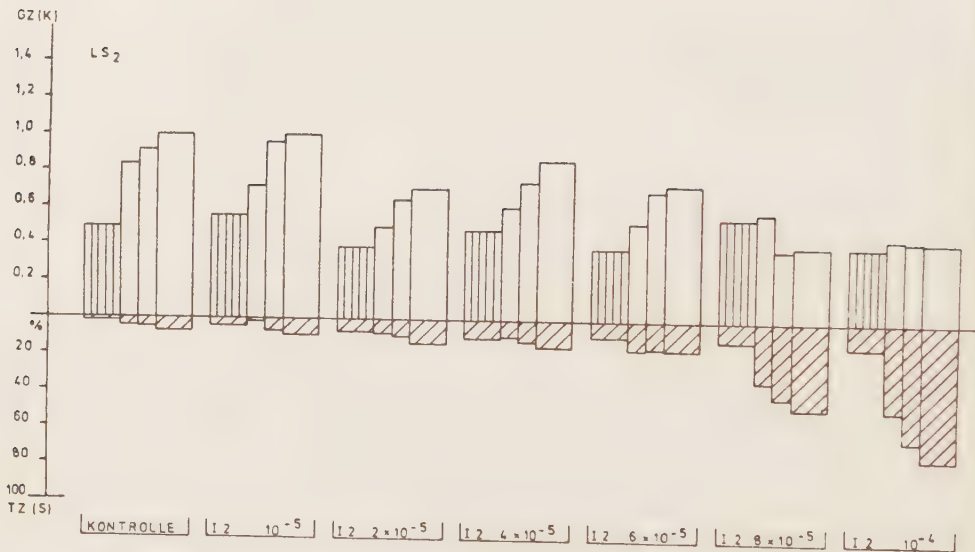


Abbildung 24 Wachstumsverhalten der LS₂-Kulturen unter Einwirkung von I₂ in steigenden Konzentrationen. Zwischen die Ausgangs- und 72-Stunden-Werte sind die Werte nach 24 und 48 Stunden eingefügt. (Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

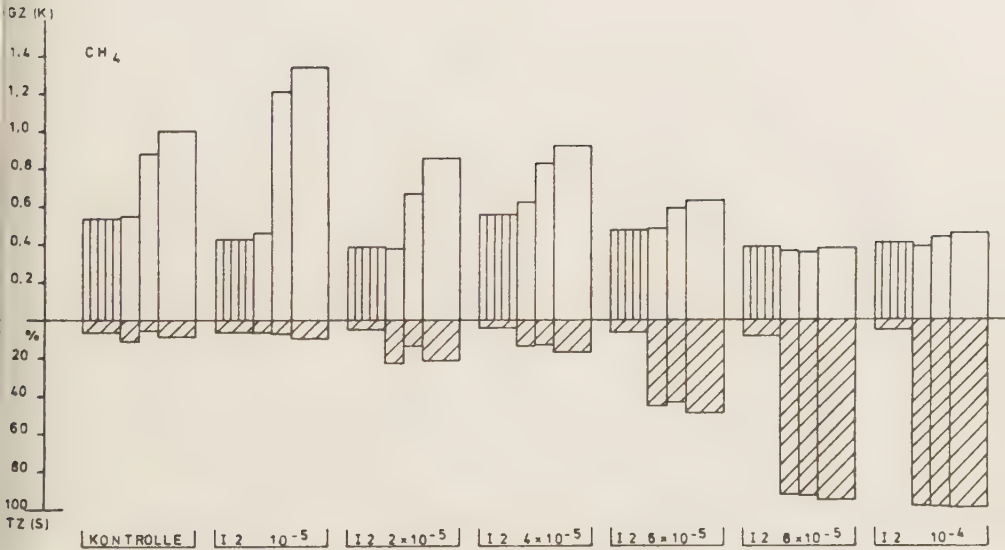


Abbildung 25 Wachstumsverhalten der CH₄-Kulturen unter Einwirkung von I₂ in steigenden Konzentrationen. Zwischen die Ausgangs- und 72-Stunden-Werte sind die Werte nach 24 und 48 Stunden eingefügt.
(Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

3.3 Beeinflussung der Hemmwirkung durch Hypoxanthinzugabe

Den Substanzen Azathioprin, 6-Mercaptopurin und dem I_2 -Derivat in einer Konzentration von 10^{-4} M wurde äquimolar 10^{-4} M Hypoxanthin zugesetzt.

Die Darstellung für die LS_2 -Kulturen erfolgt in Abbildung 26 und für die CH_4 -Kulturen in Abbildung 27.

Die bei dieser Konzentration sehr starke Hemmwirkung von Azathioprin konnte durch die Hypoxanthinzugabe teilweise antagonisiert werden. Trotzdem bleibt eine deutliche Depression des Kulturwachstums bestehen, insbesondere bei der CH_4 -Kultur. Die zytotoxische Wirkung des Azathioprin konnte durch die Hypoxanthinzugabe zwar verringert aber nicht aufgehoben werden.

Bei den mit 6-Mercaptopurin versetzten Kulturen bewirkt die Hypoxanthinzugabe eine annähernd vollständige Aufhebung sowohl der zytostatischen als auch der zytotoxischen Wirkung.

Auf die Wirkung des I_2 -Derivates zeigt die Zugabe von Hypoxanthin keinerlei Auswirkung.

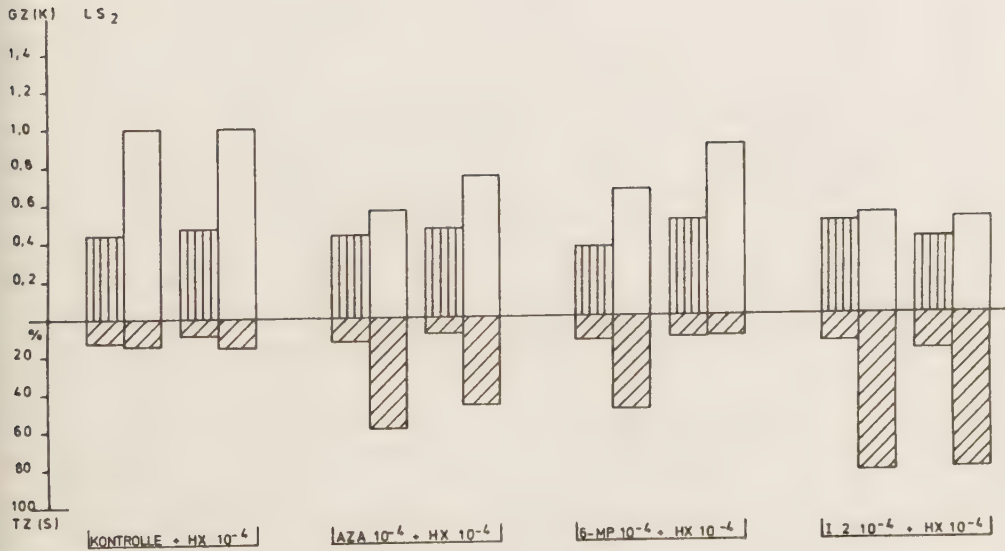


Abbildung 26 Wachstumsverhalten der LS₂-Kulturen nach Zusatz von Testsubstanzen (jeweils linker Säulenblock) und Zusatz von Testsubstanzen + Hypoxanthin (jeweils rechter Säulenblock) in einer Konzentration von 10⁻⁴ M.
(Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

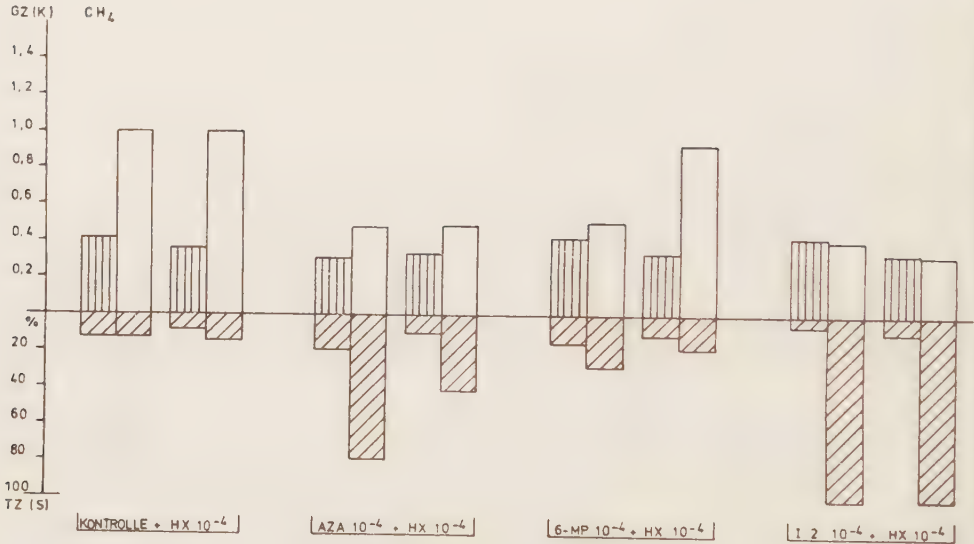


Abbildung 27 Wachstumsverhalten der CH₄-Kulturen nach Zusatz von Testsubstanzen (jeweils linker Säulenblock) und Zusatz von Testsubstanzen + Hypoxanthin (jeweils rechter Säulenblock) in einer Konzentration von 10⁻⁴ M. (Erläuterungen zur Ergebnisdarstellung s. 3.2.1, S. 53 f und Abb. 16, S. 56)

4 DISKUSSION

4.1 Definition von Zytotoxizität, Zytostase und PLD

Vorangestellt sei zunächst eine Definition der Ausdrücke Zytotoxizität, Zytostase und PLD.

Bei der Zytotoxizität handelt es sich um eine Wirkung, die das Absterben der Zelle bedingt. Das Schädigungsmuster, das der zytotoxisch wirkenden Substanz zugrunde liegt, kann vielfältig sein; die Zelle kann jedoch nur uniform mit dem Zelltod reagieren.

Bei der zytostatischen Wirkung bleibt der nach einer Kulturteilung zu erwartende Zellzahlanstieg, wie er für ungehemmt wachsende Kulturen aus Abbildung 12, S. 48 und Abbildung 14, S. 51 hervorgeht, aus oder ist deutlich geringer. Eine zytostatisch wirkende Substanz setzt also einen Schaden, der die biologische Aktivität der Zelle, hier im Sinne der Zellteilung, vermindert, ohne die Zelle jedoch letal zu schädigen.

Auch beim PLD (subletale Konditionierung, "potentially lethal damage") wird durch eine Substanz eine Aktivitätsveränderung der Zelle bedingt. Die gesetzten Zellschäden führen jedoch nicht zum Zelluntergang sondern sind durch Reparaturenzyme oder andere im Zellstoffwechsel vorliegende protektive Substanzen reversibel. Eine letale Schädigung kann jedoch erfolgen, wenn die vorgeschädigte Zelle anderen, sonst ebenfalls subletalen Einflüssen ausgesetzt ist.

4.2 Interpretation der Azathioprin-Wirkung

Wie aus Abbildung 18, S. 60 und Abbildung 19, S. 61 zu ersehen ist, tritt bei einer Azathioprin-Konzentration von 10^{-6} M noch keine signifikant von den Kontrollkulturen abweichende Wachstumsbeeinflussung auf. Wird Azathioprin jedoch in einer Konzentration von 10^{-5} M verabreicht, wird insbesondere eine zytostatische Wirkung deutlich (s. Abb. 20, S. 63 und Abb. 21, S. 64). Eine Azathioprin-Konzentration von 10^{-4} M führt zu ausgeprägtem zytotoxischem und zytostatischem Effekt (s. Abb. 22, S. 66 und Abb. 23, S. 67).

Da Azathioprin intrazellulär in die beiden Hauptmetabolite 6-Mercaptopurin und ein Imidazolderivat gespalten wird (s. 1.1.3, S. 5 ff) stellt sich die Frage, durch welches Spaltprodukt die Azathioprin-Wirkung verursacht wird.

In einer Konzentration von 10^{-5} M wird durch 6-Mercaptopurin ein ausgeprägter zytotoxischer und zytostatischer Effekt hervorgerufen (s. Abb. 20, S. 63 und Abb. 21, S. 64), keines der getesteten Imidazolderivate zeigt jedoch bei dieser Konzentration einen Einfluß auf das Zellwachstum. Es ist also zu erwarten, daß die Azathioprinwirkung bei der Konzentration von 10^{-5} M durch den 6-Mercaptopurin-Anteil hervorgerufen wird.

Die im Vergleich zur 6-Mercaptopurin-Wirkung geringere Wirksamkeit von Azathioprin kann durch die folgenden zwei Faktoren erklärt werden:

- 1) Azathioprin wird nicht äquimolar in 6-Mercaptopurin und ein Imidazolderivat aufgespalten.

Möglicherweise wird Azathioprin nicht vollständig in immunsuppressive Bestandteile aufgespalten. So erscheinen beispielsweise beim Menschen etwa 2 % der verabreichten Azathioprin-Dosis unmetabolisiert im Urin (19).

Auf die Tatsache, daß die Spaltung von Azathioprin nicht ausschließlich durch nukleophilen Angriff auf die Position 5 des Nitroringes erfolgt und daher nicht notwendigerweise eine äquimolare Menge an 6-Mercaptopurin gebildet wird, wurde bereits hingewiesen (s. 1.1.3, S. 8 f).

Ein weiterer möglicher Entgiftungsmechanismus ist die Oxidation von Azathioprin zu 8-Hydroxy-Azathioprin, welches keine immunsuppressive Valenz hat (s. 1.1.3, S. 9).

- 2) Da aus Azathioprin erst 6-Mercaptopurin freigesetzt werden muß, wäre es denkbar, daß pro Zeiteinheit nicht dieselben hohen Konzentrationen von 6-Mercaptopurin erreicht werden können wie bei direkter Gabe, da bis zur vollständigen Umwandlung von Azathioprin bereits ein Teil des zu Beginn freigesetzten 6-Mercaptopurins zu unwirksamen Abbauprodukten metabolisiert worden sein könnte.

Die schwächere Wirksamkeit von Azathioprin auf die LS_2 -Kulturen im Vergleich zu 6-Mercaptopurin wurde auch für eine äquimolare Konzentration von 8×10^{-6} M festgestellt (32).

Bei einer Konzentration von 10^{-4} M (s. Abb. 22, S. 66 und Abb. 23, S. 67) wirkt Azathioprin sowohl zytotoxisch als auch zytostatisch deutlich stärker als 6-Mercaptopurin.

Die zytotoxische Wirkung zeigt sich am deutlichsten bei den CH_4 -Zellen (s. Abb. 23, S. 67), die im Vergleich zu den LS_2 -Zellen (s. Abb. 22, S. 66) etwas vulnerabler sind. Da es sich bei beiden Zellpopulationen um Lymphoblasten handelt, also um Zellen, die sich zumindest in ihrer Enzymausstattung und in ihrem inneren Milieu nicht zu sehr voneinander unterscheiden dürften, es aber selbst hier zu unterschiedlicher Wirksamkeit bei gleicher Substanzkonzentration kommt, ist anzunehmen, daß es bei verschiedenen Zellsystemen zu deutlich ausgeprägten Wirkungsunterschieden kommt.

Berücksichtigt man die Tatsache, daß aus Azathioprin weniger 6-Mercaptopurin freigesetzt wird als der direkten äquimolaren 6-Mercaptopurin-Dosis entspricht, so wird deutlich, daß der starke Einfluß von Azathioprin auf das Zellwachstum nicht allein durch die 6-Mercaptopurin-Komponente bedingt sein kann.

Um dies zu überprüfen, wurde in weiteren Versuchsansätzen Hypoxanthin, ein Purin-Derivat, das spezifisch die Wirkung von 6-Mercaptopurin aufhebt, äquimolar zur Azathioprin- bzw. zur 6-Mercaptopurin-Dosierung zugefügt. Auf das Wirkprinzip des Hypoxanthins wird in 4.3, S. 82 näher eingegangen.

Aus Abbildung 26, S. 73 und Abbildung 27, S. 74 geht hervor, daß zwar die Wirkung von 6-Mercaptopurin durch Hypoxanthin annähernd vollständig antagonisiert werden kann, die Wirkung von Azathioprin jedoch nur abgeschwächt, aber keinesfalls aufgehoben wird. Insbesondere bei den CH_4 -Zellen wurde die Hypoxanthingabe lediglich in einer verminderten Zytotoxizität bei unbeeinflußt bleibender zytostatischer Azathioprinwirkung deutlich.

Betrachtet man die Wirkung der drei getesteten Imidazol-derivate bei der Konzentration von 10^{-4} M (Abb. 22, S. 66 und Abb. 23, S. 67), so sieht man, daß bei den Kulturen, denen das Imidazolderivat I_2 zugesetzt wurde, kein Wachstum mehr stattgefunden hatte und nach 72 Stunden fast ausschließlich tote Zellen vorlagen. Die beiden anderen Imidazol-derivate, I_1 und I_3 , zeigten bei entsprechender Konzentration keinen Einfluß auf das Zellwachstum.

Intrazelluläres Azathioprin wird, wie in Abbildung 3, S. 10 dargestellt, hauptsächlich in den Purinantagonisten 6-Mercaptopurin und eine Glutathion-Imidazol-Verbindung (MNGI) gespalten. Aus MNGI entstehen 1-Methyl-4-Nitro-5-Thioimidazole, entsprechend dem hier verwendeten I_3 , sowie andere 5-substituierte Imidazol-derivate.

Es konnte gezeigt werden, daß auch 1-Methyl-4-Nitro-5-Chlorimidazol, entsprechend dem hier getesteten I_2 , das ebenso wie Azathioprin eine alkylierende Aktivität besitzt, mit Glutathion eine entsprechende Glutathion-Imidazol-Verbindung eingehen kann und wie Azathioprin zur Freisetzung von 1-Methyl-4-Nitro-5-Thioimidazol führt (11).

Insgesamt läßt sich die ausgeprägte Azathioprin-Wirkung bei einer Konzentration von 10^{-4} M durch folgende Theorien erklären:

- 1) Die Wirkeffekte von 6-Mercaptopurin und dem Imidazol-derivat stehen in keinem Zusammenhang zueinander und addieren sich in ihrer Wirkung. Dies erscheint wenig wahrscheinlich, da, wie oben beschrieben, aus dem Imidazolanteil des Azathioprin in erster Linie 1-Methyl-4-Nitro-5-Thioimidazol entsteht, dieses allein jedoch weder eine zytotoxische noch eine zytostatische Wirkung zeigt (s. Abb. 22, S. 66 und Abb. 23, S. 67).

- 2) Durch Interferenzen, die die Imidazolderivate mit Enzymen des Zellstoffwechsels eingehen, wird die 6-Mercaptopurin-Wirkung verstärkt. So wurde beispielsweise nachgewiesen, daß Metronidazol eine reversible Hemmung der Xanthin-Oxidase bewirkt (24, 66). Sollte dies auch für 4-Nitroimidazole gelten, so würde ein Teil der Entgiftungsreaktionen des 6-Mercaptopurins wegfallen und somit mehr zytotoxisch aktives 6-Mercaptopurin vorliegen. Dagegen spricht, daß sich die Wirkung von 6-Mercaptopurin durch Konzentrationserhöhung nicht beliebig steigern läßt (vgl. Abb. 20, S. 63 mit Abb. 22, S. 66 und Abb. 21, S. 64 mit Abb. 23, S. 67) und daß trotz Antagonisierung der 6-Mercaptopurin-Wirkung durch Hypoxanthin für Azathioprin ein deutlicher zytostatischer und zytotoxischer Effekt nachweisbar bleibt (s. Abb. 26, S. 73 und Abb. 27, S. 74).
- 3) Das Imidazolderivat des Azathioprins setzt einen subletalen Zellschaden, der bei alleiniger Imidazolverabreichung reversibel ist. Trifft jedoch das ebenfalls aus Azathioprin freigesetzte 6-Mercaptopurin auf derart konditionierte Zellen, so führt dies zur Stagnation des Kulturwachstums und zu verstärktem Zelltod. Diese Theorie erscheint am wahrscheinlichsten und wird ausführlich in 4.4. S. 82 ff diskutiert.

4.3 Interpretation der 6-Mercaptopurin-Wirkung

Wie aus Abbildung 18, S. 60 und Abbildung 19, S. 61 hervorgeht, deutet sich bereits bei der niedrigen 6-Mercaptopurinkonzentration von 10^{-6} M ein leichter zytostatischer Effekt an. Da das Kulturwachstum aber noch im Rahmen der üblichen Schwankungsbreite liegt, kann keine definitive Aussage über eine Wachstums-einschränkung durch 10^{-6} M 6-Mercaptopurin gemacht werden.

Bei der nächsthöheren Konzentration von 10^{-5} M 6-Mercaptopurin (s. Abb. 20, S. 63 und Abb. 21, S. 64) ist sowohl der zytotoxische als auch der zytostatische Effekt von 6-Mercaptopurin ausgeprägt. Betrachtet man hierzu die Abbildungen 22, S. 66 und 23, S. 67, in denen entsprechende Experimente mit 10^{-4} M 6-Mercaptopurin durchgeführt wurden, so erkennt man, daß eine Konzentrationserhöhung von 6-Mercaptopurin auf das zehnfache die Wirkung auf das Kulturwachstum nicht mehr steigern konnte.

Hieraus ist zu folgern, daß für die 6-Mercaptopurin-Wirkung eine Sättigungskinetik angenommen werden darf. Dies ließe sich gut mit der Wirkung von 6-Mercaptopurin als kompetitiver Enzyminhibitor an mehreren Enzymen des Purinstoffwechsels in Einklang bringen (s. 1.2.2.1, S. 11 ff). Sind die verfügbaren Akzeptoren besetzt, kann eine Wirkungssteigerung durch Konzentrationserhöhung nicht mehr erfolgen.

Eine Konzentrationserhöhung dürfte also nur noch zu den beiden folgenden hypothetischen Wirkungen führen:

- 1) Durch mehr frei vorliegendes 6-Mercaptopurin könnte dessen Abbau, möglicherweise im Sinne einer Entgiftungsreaktion, verlangsamt werden.
- 2) Die Dauer der Wirksamkeit könnte durch das in höherer Konzentration ungebunden vorliegende 6-Mercaptopurin verlängert werden.

Geht man davon aus, daß 6-Mercaptopurin als kompetitiver Enzyminhibitor in den Purinstoffwechsel eingreift, so muß postuliert werden, daß die 6-Mercaptopurin-Wirkung durch Gabe von Purinen zumindest teilweise aufgehoben werden kann.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde den Kulturen gleichzeitig 10^{-4} M 6-Mercaptopurin und 10^{-4} M Hypoxanthin, ein Purinderivat, zugesetzt. Wie Abbildung 26, S. 73 und Abbildung 27, S. 74 zu entnehmen ist, ist die Hemmwirkung, die 6-Mercaptopurin bedingt, durch zusätzliche Gabe von Hypoxanthin beinahe vollständig aufgehoben. Damit kann der Wirkungsmechanismus von 6-Mercaptopurin als Purinantagonist bestätigt werden.

4.4 Interpretation der Imidazolwirkung

Wie aus den Abbildungen 18 bis 23, S. 60 ff zu entnehmen ist, zeigt sich für die beiden Imidazolderivate I_1 (1-Methyl-5-Chlor-Imidazol) und I_3 (1-Methyl-4-Nitro-5-Thio-Imidazol) in den Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-4} M kein Effekt auf das Kulturwachstum. Das Imidazolderivat I_2 (1-Methyl-4-Nitro-5-Chlor-Imidazol) erweist sich in einer Konzentration von 10^{-6} M (s. Abb. 18, S. 60 und Abb. 19, S. 61) sowie von 10^{-5} M (s. Abb. 20, S. 63 und

Abb. 21, S. 64) ebenfalls als unwirksam. Wird das I_2 -Derivat jedoch in einer Konzentration von 10^{-4} M den Zellkulturen zugesetzt, so findet praktisch kein Kulturwachstum mehr statt; nach 72 Stunden finden sich kaum noch lebende Zellen (s. Abb. 22, S. 66 und Abb. 23, S. 67).

Um festzustellen, bei welcher Konzentration das I_2 -Derivat zu wirken beginnt, wurde eine Verdünnungsreihe zwischen den Konzentrationen 10^{-5} M und 10^{-4} M durchgeführt. (s. Abb. 24, S. 70 und Abb. 25, S. 71). Dabei stellte sich heraus, daß zwar eine langsame Hemmung des Kulturwachstums mit zunehmender I_2 -Konzentration festgestellt werden kann, eine deutliche Wirkungszunahme mit Anstieg der Zytotoxizität jedoch sehr plötzlich im Sinne einer Schwellenkonzentration zu verzeichnen ist. Diese liegt für die LS_2 -Zellen bei 8×10^{-5} M, für die CH_4 -Zellen bereits bei 6×10^{-5} M. Offensichtlich werden also niedrige Konzentrationen des Imidazolderivates von der Zelle noch gut toleriert und erst ab einer gewissen Wirkstoffkonzentration kann das Derivat die Zelle letal schädigen.

Diese Tatsache stimmt mit den in der Literatur berichteten Wirkungsweisen der Imidazole überein, auf die im folgenden kurz eingegangen werden soll.

4.4.1 Konzentrationsabhängigkeit der Nitroimidazolwirkung

Die Wirkung der Imidazolderivate ist, wie in Abbildung 28 dargestellt, konzentrationsabhängig und scheint mit der Fähigkeit des Imidazolderivates, Radikale zu erzeugen und als Elektronen-Akzeptor zu fungieren korreliert zu sein (39, 89, 93).

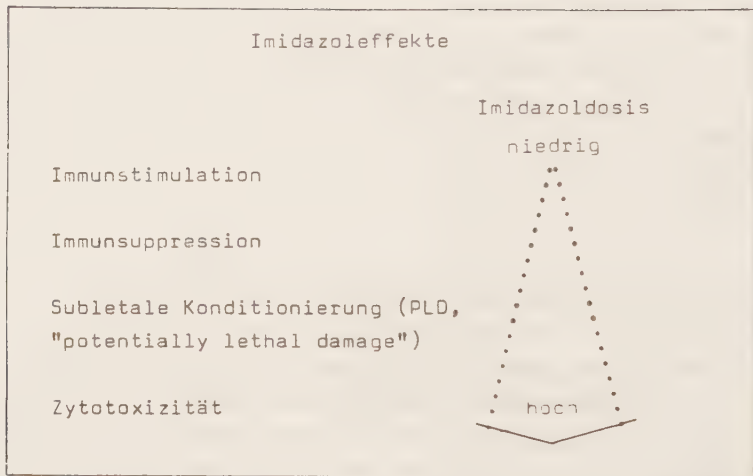


Abbildung 28 Konzentrationsabhängigkeit der Imidazoleffekte

In niedriger Konzentration können Imidazole durch Aktivierung von Makrophagen und Monozyten immunstimulierend wirken. In höherer Konzentration kommt es zunächst zu einem immunsuppressiven, bei noch weiterer Konzentrationserhöhung zu einem zytotoxischen Effekt (39, 89, 93). Interessant erscheint der dazwischenliegende Konzentrationsbereich, in dem die toxischen Effekte subletal und, nach Entfernung des schädigenden Agens, reversibel sind.

4.4.2 Subletale Konditionierung (PLD)

Auf diesen Konzentrationsbereich mit reversibler Imidazolvirkung sei nun kurz eingegangen. In Abbildung 29 sind die möglichen Imidazolvirkungen zur Erzeugung eines PLD zusammengefaßt.

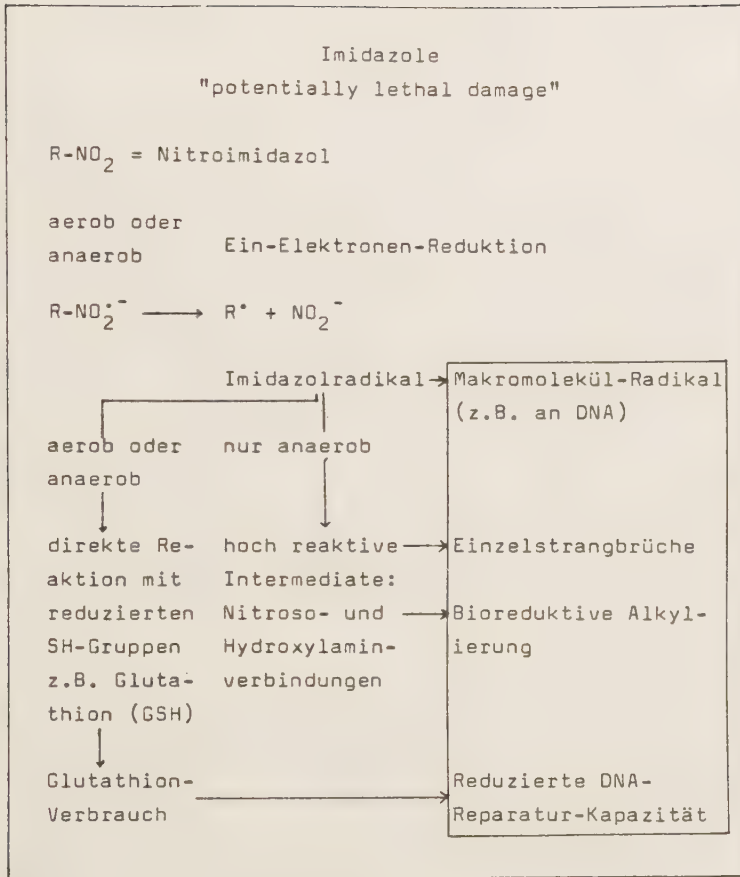


Abbildung 29 Möglichkeiten der subletalen Konditionierung (PLD) durch Imidazole

Auf die Ein-Elektronen-Reduktion und die Bildung toxischer Intermediate wurde bereits in 1.3.2.1, S. 23 ff eingegangen.

4.4.2.1 DNA-Einzelstrangbrüche

Von Palcic und Skarsgard (63) konnte gezeigt werden, daß sowohl Misonidazol als auch Metronidazol DNA-Einzelstrangbrüche induzieren. Zu diesen Brüchen soll es jedoch nur in hypoxischen Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration und Expositionsdauer des Nitroimidazols und der Temperatur kommen. Letal geschädigte Zellen zeigten eine große Anzahl von DNA-Brüchen. Überlebende Zellen jedoch, sofern sie nach Entfernung des Nitroimidazols weiter inkubiert wurden, reparierten ihre DNA-Schäden so weitgehend, daß die Sedimentationsprofile identisch mit Kontrollkulturen waren, die keiner Nitroimidazoleinwirkung ausgesetzt waren.

Als Erklärungsansatz stellen Palcic und Skarsgard (63) unter der Prämisse, daß das Zielmolekül für den zytotoxischen Effekt der Nitroimidazole die DNA sei, das folgende Modell auf:

Misonidazol dringt unverändert in die Zellen ein, wo es reduziert wird. Eine oder einige der reduzierten Verbindungen binden sich an die DNA; Reparaturenzyme erkennen den Schaden und spalten die DNA. Die geschädigten Abschnitte werden entfernt und die weitere Korrektur erfolgt so, wie durch UV-Strahlung induzierte DNA-Korrektur.

Solange nur wenige Stellen in der DNA geschädigt sind, können die Zellen diesen Schaden effektiv korrigieren. Liegen die gesetzten DNA-Schäden jedoch in räumlicher Nähe zueinander und im jeweils anderen Strang der DNA-Doppelhelix, so ist ein korrekter DNA-Aufbau wegen des Fehlens komplementärer Basen nicht mehr möglich und es kommt zu Resynthese-Fehlern. Dies ist in Abbildung 30 dargestellt.

DNA-Einzelstrangschäden

reversibel



DNA mit Einzelstrangschaden



Spaltung durch die Endonuklease



Ausräumung der fehlerhaften Stelle durch die Exonuklease



Ergänzung am komplementären Strang durch die DNA Polymerase



Bindung durch die Polynukleotid-Ligase

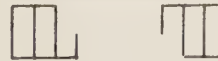
irreversibel



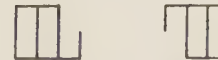
DNA mit 2 Einzelstrangbrüchen



Spaltung durch die Endonuklease



Ausräumung durch die Exonuklease



Ergänzung wegen fehlender komplementärer Sequenz nicht möglich



Die freien Enden paaren sich mit entsprechenden Stellen anderer Regionen und führen zu ineffektiven DNA-Abschnitten

Abbildung 30 Darstellung von reversiblen und irreversiblen DNA-Schädigungen (mod. nach (5))

4.4.2.2 Bioreduktive Alkylierung

Nitroimidazole können als alkylierende Substanzen wirken. Alkylierende Verbindungen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie mit nukleophilen Resten, also Gruppen mit freiem Elektronenpaar reagieren. Aufgrund ihrer hohen Reaktionsfähigkeit kann dies mit vielen Zellbestandteilen und in jedem Stadium des Zellzyklus erfolgen (59). Eine wichtige Reaktion ist die Methylierung bzw. Äthylisierung des N-Atoms 7 des Guanins, wodurch diese Base von der DNA abfällt (64).

So ahmen alkylierende Substanzen in gewisser Weise die Wirkung einer Bestrahlung nach, dahingehend, daß ihre Aktivität gegen Zellen das Ergebnis einer Interaktion mit und damit eines physikalischen Schadens an der DNA ist.

Obwohl Unterschiede zwischen den DNA-Läsionen bestehen, je nachdem, ob sie von alkylierenden Substanzen oder von ionisierenden Strahlen verursacht werden, ist der Schaden bei beiden Arten von der Entstehung von Verbindungen mit freien Radikalen abhängig (16).

4.4.2.3 Wechselwirkungen mit intrazellulären Elektronen-Donatoren

Insgesamt werden Redox-Reaktionen zwischen dem Nitroimidazol und mehreren intrazellulären Strukturen als Wirkprinzip angenommen. Die Wirksamkeit eines Nitroimidazols steigt mit zunehmender Elektronenaffinität (s. 1.3.2.1, S. 25 und S. 29). Durch die Fähigkeit, Elektronen auf sich zu ziehen, stören Nitroimidazole das Gleichgewicht der Zelle, das durch ständig ablaufende Oxidationsvor-

gänge an DNA, Proteinen und Membranen mit Bildung von freien Radikalen und Reduktionsvorgänge, bei denen Glutathion eine wichtige Rolle spielt, gekennzeichnet ist.

Glutathion ist ein Tripeptid aus Glycin, Cystein und Glutamat. Eine besondere Bedeutung für die Funktion besitzt die Sulfhydryl-(SH-) Gruppe des Cysteinylrestes, die bei physiologischem pH in undissoziiertem Zustand vorliegt. Diese SH-Gruppe wirkt als Elektronendonator. Glutathion wird dadurch zum Disulfid oxidiert. Oxydiertes und reduziertes Glutathion bilden ein biologisches Redoxsystem, bei dem die reduzierte Form zu 98 % vorliegt. Wegen der leichten Oxidierbarkeit von Glutathion muß reduziertes Glutathion ständig durch eine Glutathionreductase, die mit NADPH aus dem Pentose-Phosphatweg arbeitet, regeneriert werden (64).

Es wurde berichtet, daß Glutathion die Zelle vor der zytotoxischen Wirkung von Nitroimidazolen schützt (9, 10, 84). Der durch die Elektronenaffinität der Nitroimidazole an intrazellulären Strukturen gesetzte Schaden in Form einer Radikal-Bildung kann durch die Übernahme eines Elektrons von reduziertem Glutathion behoben werden.

Ebenso wie Glutathion soll die Sulfhydryl-Verbindung Cysteamin hypoxische Zellen gegen die Zytotoxizität von Misonidazol schützen (29). Von Stratford und Gray wurde darauf hingewiesen, daß diese Protektion allgemein für Verbindungen mit freien SH-Gruppen gelten könnte (77). Daß Nitroimidazole, ebenso wie Sauerstoff, schnell mit Sulfhydryl-Verbindungen, zumindest in Gegenwart von Eisen-Ionen, reagieren können, scheint bewiesen zu sein (6). Zumindest ein Teil der Toxizität von Misonidazol wird auf eine Entleerung intrazellulärer SH-Vorräte zurückgeführt (29, 77).

Sind die intrazellulären SH-Vorräte durch Bindung an Nitroimidazole erschöpft, stehen für die Reduktion der an intrazellulären Strukturen durch elektronenaffine Substanzen gesetzten Schäden keine Wasserstoff-Donatoren mehr zur Verfügung. Da diese Rolle intrazellulär insbesondere dem Glutathion zukommt, führt besonders die Entleerung der Vorräte an reduziertem Glutathion zu einer kritischen Situation. Sobald die Kapazität der Glutathionreduktase überschritten ist, kann der bis zu diesem Zeitpunkt evtl. reversible Zellschaden, der durch Nitroimidazole gesetzt wird, in die irreversible, das heißt zytotoxische Form übergehen.

Auch nicht-steroidale, antiphlogistische Agentien sollen vor der durch Nitroimidazole induzierten Zytotoxizität schützen. Dies wurde sowohl unter hypoxischen als auch unter aeroben Bedingungen für die Substanzen Benoxoprofen, Indometacin, Acetylsalicylsäure (51) als auch für Flurbiprofen (52) nachgewiesen. Es wird angenommen, daß diese Substanzen möglicherweise den Metabolismus in toxische Spezies hemmen (51).

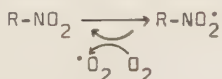
4.4.3 Sensitizer-Wirkung

Die Auswirkungen der Nitroimidazole auf die Zelle sind in einem bestimmten Konzentrationsbereich, wie unter 4.4.2, S. 84 ff beschrieben, reversibel, solange kein zusätzlicher schädigender Einfluß auf die Zelle vorliegt. Sie können aber die Schäden, die der Zelle durch Bestrahlung oder Zytostatika zugefügt werden, fixieren und so zum Zelltod führen.

Wie in 1.3.2.2, S. 27 ff erwähnt, wurden Nitroimidazole bereits früh als radiosensibilisierende Substanzen erkannt. Die Wirkung der Radiosensitizer auf hypoxische

Zellen entspricht der O_2 -Wirkung darin, daß auch sie freie Radikale bilden oder Redox-Reaktionen eingehen können (58). Der Vorteil ist, daß sie nicht so schnell wie O_2 metabolisiert werden und daher die Fähigkeit besitzen, von den Kapillaren in die entfernten hypoxischen Zellen eines Tumors zu diffundieren (61, 77).

Eine Erklärungsmöglichkeit für die Wirkungspräferenz der Nitroimidazol-Wirkung auf hypoxische Zellen ist, daß die Umwandlung in toxische Intermediate, wie in 1.3.2.1, S. 23 ff beschrieben, in euoxischen Zellen durch O_2 mit seiner höheren Elektronenaffinität gehemmt wird. Dies mag durch folgende Gleichung veranschaulicht werden:



Den Wirkungsmechanismus der Nitroimidazole als Radiosensitizer stellt man sich folgendermaßen vor:

Die Energie, die durch Bestrahlung direkt auf ein intrazelluläres Zielmolekül, hier beispielsweise die DNA, einwirkt, induziert seine Polarisierung. Das herausgeschlagene Elektron und das positive Ion können sich wieder vereinigen, oder das Elektron kann entlang dem DNA-Molekül wandern und sich mit einem an anderer Stelle entsprechend entstandenen Radikal vereinigen. Ist nun ein Sensitizer mit hoher Elektronenaffinität vorhanden, so kann das Elektron auf den Sensitizer übergehen. Das Ziel-Kation bleibt dadurch ein Radikal (Adams and Jameson, 1980, aus (58)).

Der entsprechende Vorgang kann nicht nur an einem biologisch wichtigen Zielmolekül, wie der DNA erfolgen, sondern auch durch die Aktion von hydrierten Elektronen,

Hydroxyl-Radikalen oder anderen Radikalen, die durch die Bestrahlungsenergie auf das wäßrige Umgebungsmilieu entstanden sind (14). Sind nun genügend reduzierende Substanzen, wie beispielsweise Glutathion mit seiner SH-Gruppe vorhanden, kann der durch ein Radikal entstandene Schaden repariert werden. Sind die SH-Speicher entleert, ist der Schaden durch Oxidation fixiert.

Wie in 1.3.2.2, S. 28 erwähnt, steigt die Radiosensibilisierungsfähigkeit einer Nitroimidazolverbindung mit der Elektronenaffinität. Nun steigern aber Nitroimidazole aus bisher ungeklärtem Grund den mikrosomalen O_2 -Verbrauch der Zelle, und zwar steigt er ab einer definierten Schwelle exponential mit dem Redox-Potential der Verbindung (28).

Da aber stimulierter Sauerstoff-Verbrauch eine Zelle in einen hypoxischen, radioresistenten Status überführen kann, sind Verbindungen mit zu hoher Elektronenaffinität als Radiosensitizer ungeeignet. Andererseits kann stimulierter Sauerstoff-Verbrauch die Bildung von selektiv zytotoxischen Intermediaten in schwach oxygenierten Regionen eines Tumors steigern, was stark elektronenaffine Nitroimidazole für die Anwendung in der Chemotherapie interessant machen könnte (28).

4.5 4-Nitroimidazole

4.5.1 Besondere Stellung in der Gruppe der Nitroimidazole

Wie bereits in 1.3.2.1, S. 25 erwähnt, besitzen 4-Nitroimidazole im Vergleich zu 2- und 5-Nitroimidazolen eine niedrigere Elektronenaffinität (2, 4. 88).

Sowohl die radiosensibilisierende als auch die zytotoxische Wirkung scheinen aber nicht ausschließlich von der Elektronenaffinität abzuhängen.

Adams et al. (1) stellten bei Versuchen mit 4-Nitroimidazolen fest, daß einige dieser Verbindungen überraschenderweise wesentlich effektiver als Radiosensitizer sind, als gemäß ihrer Elektronenaffinität hätte vorausgesagt werden können.

So erwiesen sich gemäß unveröffentlichter Daten von Adams et al., welche 4-Nitroimidazole mit 5-Nitroimidazolen verglichen, die 5-Nitroimidazole als weniger effektive Radiosensitizer in vitro als ähnlich substituierte 4-Nitroimidazole, obwohl die vorgenannten eine höhere Elektronenaffinität besitzen (aus (58)).

Hinter die Forderung, daß außer der Elektronenaffinität auch noch andere Faktoren die Radiosensibilisierungseigenschaften bestimmen, stellen sich auch Clarke und Wardman (15). Sie zeigten, daß die Verbindung 1-Methyl-4-Nitro-5-Chlor-Imidazol (entsprechend dem I₂ in den hier beschriebenen Versuchen) im Vergleich zu anderen 4-Nitroimidazolen eine gleich starke Radiosensibilisierung in 100-fach niedrigerer Konzentration ergab.

Dies wurde auch von Watts und Jakob (88) bestätigt, die mit dieser Verbindung eine OER von 1,6 bei einer Konzentration von 5×10^{-5} M erhielten, obwohl man dies beim Redox-Potential von -515 mV für diese Verbindung erst bei einer Konzentration von 5×10^{-3} M hätte erwarten können.

Sie führen dies darauf zurück, daß die Redox-Potentiale, welche durch Puls-Radiolyse bestimmt werden, ungenau

sein könnten, denn die Struktur des 1-Methyl-4-Nitro-5-Chlor-Imidazols müßte eine ziemlich hohe Elektronenaffinität ergeben, bedingt durch die Anwesenheit des stark elektronenaffinen Chlor-Atoms.

Sie gehen davon aus, daß diese Verbindung möglicherweise dissoziiert, bevor sie mit dem Redox-Indikator reagiert. Dann würde das aktuell gemessene Redox-Potential dem eines neutralen freien Radikals entsprechen (88).

Chalmers fand, daß die Substanz 1-Methyl-4-Nitro-5-Chlor-Imidazol (I_2) wie Azathioprin selbst mit Sulfhydryl-Verbindungen reagieren kann. Ein Beispiel ist die Reaktion mit Glutathion, die zu der Verbindung 5-Glutathionyl-1-Methyl-4-Nitro-Imidazol (MNGI) führt (11, 12), demselben Produkt, das aus der Spaltung von Azathioprin entstehen kann und ein Vorläufer von Mercaptoimidazol sein soll (11) (s. 4.2, S. 79).

Für Chlorimidazol wurde nachgewiesen, daß es die Antikörperbildung von Mäusen gegen Schafserythrozyten supprimiert, wogegen sich MNGI ohne Effekt darauf zeigte (12). Es wird daher als wahrscheinlich angenommen, daß die alkylierende Aktivität der Imidazolgruppe, die sowohl Chlorimidazol als auch Azathioprin besitzen (s. 4.4.2.2, S. 88), zu den immunsuppressiven Effekten dieser beiden Substanzen beiträgt (11, 12).

4.5.2 Immunsuppressive Potenz der getesteten Nitroimidazole

Betrachtet man die Wirkungen der hier getesteten Imidazol-derivate auf das Kulturwachstum, so sieht man, daß nur das I_2 -Derivat (1-Methyl-4-Nitro-5-Chlor-Imidazol) in einer Konzentration ab 6×10^{-5} M für die CH_4 -Zellen bzw. ab 8×10^{-5} M für die LS_2 -Zellen (s. Abb. 25, S. 71 und Abb. 24, S. 70) einen ausgeprägten zytotoxischen und zytostatischen Effekt zeigt.

Die Imidazole I_1 (1-Methyl-5-Chlor-Imidazol) und I_3 (1-Methyl-4-Nitro-5-Thioimidazol) zeigen in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluß im Sinne einer Wachstums- hemmung oder verstärkter Zytotoxizität. Es ist anzunehmen, daß auch für diese Derivate eine Schwellenkonzentration besteht, ab der sie wirksam werden, allerdings scheinen hierzu etwa 100-fach höhere Konzentrationen als für das I_2 -Derivat nötig zu sein (s. 4.5.1, S. 93). In den durchgeführten Versuchen wurde dieser Fragestellung nicht weiter nachgegangen, da sich für zu hohe erforderliche Konzentrationen keine klinische Relevanz ergibt.

Der Grund für die Wirkungspräferenz des I_2 -Derivates dürfte in der Anwesenheit des Chlor-Atoms in der Nachbarschaft der Nitro-Gruppe liegen (s. 4.5.1, S. 94). Da sowohl das Chlor-Atom als auch die Nitro-Gruppe elektronenaffin sind, können sie kombiniert eine gesteigerte Wirksamkeit entfalten.

Da die Wirkungsweise der Nitroimidazole konzentrationsabhängig ist (s. Abb. 28, S. 84), stellt sich die Frage, ob unterhalb der Schwellenkonzentration von 6×10^{-5} M (CH_4) bzw. 8×10^{-5} M (LS_2) das I_2 -Derivat eine subletale Konditionierung der Zellen bedingt. Durch die kombinierte Verabreichung von I_2 und einem Chemotherapeutikum in jeweils subletaler Konzentration konnte gezeigt werden, daß niedrigere I_2 -Konzentrationen einen Zellschaden im Sinne eines PLD setzen (32).

Insgesamt ist aus den durchgeführten Experimenten klar zu erkennen, daß die immunsuppressive Wirkung von Azathioprin durch 6-Mercaptopurin und das Imidazolderivat bedingt wird, wobei die Bedeutung des Imidazolanteils mit steigender Konzentration zunimmt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Azathioprin ist ein Immunsuppressivum, das intrazellulär in 6-Mercaptopurin und ein Imidazolderivat aufgespalten wird. Die immunsuppressive Wirkung von 6-Mercaptopurin ist bekannt und beruht auf dem Purinantagonismus. Das Ziel der durchgeführten Versuche war, nachzuweisen, daß auch dem Imidazolanteil eine wesentliche Bedeutung für die immunsuppressive Wirkung von Azathioprin zukommt.

Dazu wurden zwei verschiedene undifferenzierte menschliche Lymphoblastenkulturen in vitro mit verschiedenen Konzentrationen von Azathioprin, 6-Mercaptopurin und drei synthetisierten Imidazolverbindungen inkubiert. Bei den Imidazolen handelte es sich um 1-Methyl-5-Chlor-Imidazol (I_1), 1-Methyl-4-Nitro-5-Chlor-Imidazol (I_2) und 1-Methyl-4-Nitro-5-Thio-Imidazol (I_3).

In einer Konzentration von 10^{-6} M konnte für keine der aufgeführten Substanzen eine Wirksamkeit nachgewiesen werden. In einer Konzentration von 10^{-5} M zeigt 6-Mercaptopurin einen ausgeprägten zytotoxischen und zytostatischen Effekt. Auch für Azathioprin war in dieser Konzentration eine Wachstumshemmung mit Zunahme der toten Zellen nachweisbar, die, da die Imidazolderivate keine Wirkung zeigten, auf den 6-Mercaptopurin-Anteil zurückgeführt werden muß.

Bei der Konzentration von 10^{-4} M fand in den mit I_2 versetzten Kulturen kein Wachstum mehr statt bei fast 100 %iger Zytotoxizität. Die Wirkung von 6-Mercaptopurin hatte sich trotz 10-facher Konzentrationserhöhung nicht mehr steigern lassen und Azathioprin zeigte eine ausgeprägtere zytostatische und zytotoxische Wirkung als 6-Mercaptopurin, die also wesentlich mit durch den Imidazolanteil bedingt worden sein muß.

Um die Bedeutung des Imidazolanteils bei der Immunsuppression von Azathioprin zu sichern, wurde allen Kulturen zusätzlich zu den Wirksubstanzen äquimolar Hypoxanthin, ein Purinderivat, zugesetzt. Die Wirkung von 6-Mercaptopurin konnte dadurch aufgehoben werden, auf die Imidazolderivate zeigte Hypoxanthin keinen Einfluß. Die Wirksamkeit von Azathioprin konnte durch Hypoxanthinzugabe zwar abgeschwächt, aber nicht aufgehoben werden, was bestätigt, daß die Wirkung in diesem Konzentrationsbereich wesentlich auf das Imidazolderivat zurückgeführt werden kann.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde in einer Verdünnungsreihe der Wirkbeginn von I_2 festgestellt, der im Sinne einer Schwellenkonzentration bei 6×10^{-5} M bzw. 8×10^{-5} M liegt.

Aus den durchgeführten Experimenten geht klar hervor, daß zur immunsuppressiven Wirkung von Azathioprin sowohl der 6-Mercaptopurin- als auch der Imidazolanteil beitragen, wobei die Bedeutung des Imidazolanteils mit steigender Konzentration wächst.

6 LITERATUR

- 1 Adams, G.E., J. Ahmed, E.M. Fielden, P. O'Neill, J.G. Stratford: The development of some nitroimidazoles as hypoxic cell sensitizers. *Cancer Clin. Trials* 3 (1980a) 37.
- 2 Adams, G.E., E.D. Clarke, I.R. Flockhart, R.S. Jacobs, D.S. Sehmi, I.J. Stratford, P. Wardman, M.E. Watts: Structure-activity relationships in the development of hypoxic cell radiosensitizers. *Int. J. Radiat. Biol.* 35 (1979) 133.
- 3 Adams, G.E., D.L. Dewey: Hydrated electrons and radiobiological sensitization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12 (1963) 473.
- 4 Adams, G.E., I.R. Flockhart, C.E. Smithen, I.J. Stratford, P. Wardman, M.E. Watts: A correlation between structures, one-electron reduction potentials, and efficiencies of nitroimidazoles as hypoxic cell radiosensitizers. *Radiat. Res.* 67 (1976) 9.
- 5 Bachmann, K. (Hrsg.): *Biologie für Mediziner*, S. 125 ff. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1976.
- 6 Bahnemann, D., H. Basaga, J.R. Dunlop, A.J.F. Searle, R.L. Willson: Metronidazole (Flagyl), misonidazole (Ro 07-0582), iron, zinc and sulphur compounds in cancer therapy. *Br. J. Cancer* 37, Suppl. 3 (1978) 16.
- 7 Biaglow, J.E.: Cellular electron transfer and radical mechanisms for drug metabolism. *Radiat. Res.* 86 (1981) 212.
- 8 Biaglow, J.E., F. Oddvar, N. Greenstock, C.L. Greenstock: Electron transfer in Ehrlich ascites tumor cells in the presence of nitrofurans. *Biochem. Pharmacol.* 25 (1976) 393.
- 9 Bump, E.A., Y.C. Taylor, J.M. Brown: Role of glutathione in the hypoxic cell cytotoxicity of misonidazole. *Cancer Res.* 43 (1983) 997.
- 10 Bump, E.A., N.Y. Yu, J.M. Brown: Radiosensitization of hypoxic tumor cells by depletion of intracellular glutathione. *Science* 27 (1982) 544.

- 11 Chalmers, A.H.: Studies on the mechanism of formation of 5-mercapto-1-methyl-4-nitroimidazole, a metabolite of the immunosuppressive drug azathioprine. *Biochem. Pharmacol.* 23 (1974) 1891.
- 12 Chalmers, A.H., T. Burdorf, A.W. Murray: Immunosuppression by 9-alkyl-6-thiopurines. *Biochem. Pharmacol.* 21 (1972) 2662.
- 13 Chalmers, A.H., P.R. Knight, M.R. Atkinson: 6-thiopurines as substrates and inhibitors of purine oxidases: a pathway for conversion of azathioprine into 6-thiouric acid without release of 6-mercapto-purine. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 47 (1969) 263.
- 14 Chapman, J.D., C.J. Gillespie: Radiation-induced events and their time scale in mammalian cells. *Adv. Radiat. Biol.* 9 (1981) 143.
- 15 Clarke, E.D., P. Wardman: Are ortho-substituted 4-nitroimidazoles a new generation of radiation-induced arylating agents? *Int. J. Radiat. Biol.* 37 (1980) 463.
- 16 Clement, J.J., M.S. Gorman, I. Wodinsky, R. Catane, K. Johnson: Enhancement of antitumor activity of alkylating agents by the radiation sensitizer miso-nidazole. *Cancer Res.* 40 (1980) 4165.
- 17 Dunclos, H., M.C. Maillot, P. Galanaud: Differential effects of azathioprine on T-cells regulating murine B-cell function. *Immunology* 46 (1982) 595.
- 18 Edwards, D.J., R.J. Knox, R.C. Knight: Structure-cytotoxicity relationships of nitroimidazoles in an in vitro system. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 8 (1982) 791.
- 19 Elion, G.B.: The comparative metabolism of "Imuran" and 6-mercaptopurine (6-MP) in man. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 10 (1969) 21.
- 20 Elion, G.B.: The significance of azathioprine metabolites. *Proc. roy. Soc. Med.* 65 (1972) 257.
- 21 Elion, G.B., G.H. Hitchings: Azathioprine. In: Eichler, O., A. Farah, H. Herken, A.D. Welch (eds.): *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Vol. 38/2, 404. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1975.
- 22 Foster, J.L., P.J. Conroy, A.J. Searle, R.L. Willson: Metronidazole (Flagyl): Characterization as a cytotoxic drug specific for hypoxic tumour cells. *Br. J. Cancer* 33 (1976) 485.

- 23 Foster, J.L., R.L. Willson: Radiosensitization of anoxic cells by metronidazole. Br. J. Radiol. 46 (1973) 234.
- 24 Fried, R., L.W. Fried: The effect of Flagyl on xanthine oxidase and alcohol dehydrogenase. Biochem. Pharmacol. 15 (1966) 1890.
- 25 Furth, R.v., A.E. Gassmann, M.M.C. Diesselhoff-Den Dulk: The effect of azathioprine (Imuran) on the cell cycle of promonocytes and the production of monocytes in the bone marrow. J. Exp. Med. 141 (1975) 531.
- 26 Glogner, P., N. Heni: Panzytopenie nach Kombinationsbehandlung mit Allopurinol und Azathioprin. Med. Welt 27, 33 (1967) 1545.
- 27 Grey, L.H., A.D. Conger, M. Ebert, S. Hornsey, D.C.A. Scott: The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. Br. J. Radiol. 26 (1953) 638.
- 28 Greenstock, C.L., J.E. Biaglow, R.E. Durand: Effects of sensitizers on cell respiration: II. The effects of hypoxic cell sensitizers on oxygen utilization in cellular and chemical models. Br. J. Cancer 37, Suppl. 3 (1978) 11.
- 29 Hall, E.J., M. Astor, C. Geard, J. Biaglow: Cytotoxicity of Ro-07-0582; Enhancement by hyperthermia and protection by cysteamine. Br. J. Cancer 35 (1977) 809.
- 30 Hall, E.J., R. Miller, M. Astor, F. Rini: The nitroimidazoles as radiosensitizers and cytotoxic agents. Br. J. Cancer 37, Suppl. 3 (1978) 120.
- 31 Hall, E.J., L. Roizin-Towle: Hypoxic sensitizers: Radiobiological studies at the cellular level. Radiology 117 (1975) 453.
- 32 Herbst, R.: Die lymphozytotoxische Wirkung von 1-Methyl-4-Nitro-5-Chloro-Imidazol und seine Interaktion mit den zytostatisch wirksamen Antimetaboliten Methotrexat und 5-Fluorouracil. Thesis, München 1987.
- 33 Hinchliffe, M., M.J. McNally, M.R.L. Stratford: The effect of radiosensitizers on the pharmacokinetics of melphalan and cyclophosphamide in the mouse. Br. J. Cancer 48 (1983) 375.
- 34 Hirst, D.G., J.M. Brown, J.L. Hazlehurst: Enhancement of CCNU cytotoxicity by misonidazole: Possible therapeutic gain. Br. J. Cancer 46 (1982) 109.

- 35 Kärcher, K.H., V. Nitsche, H.D. Kogelnik, T. Szepesi:
Strahlensensibilisierung mit Metronidazol: Pharmako-
kinetischer Vergleich an Hand von Blutspiegelkurven
nach Verabreichung von Metronidazol in Form von
Tabletten, Suppositorien und Klistier. Strahlen-
therapie 155 (1979) 811.
- 36 Kaplowitz, N.: Enzymatic thiolysis of azathioprine in
vitro. Biochem. Pharmacol. 25 (1976) 2421.
- 37 Kaplowitz, N.: Interaction of azathioprine and gluta-
thione in the liver of the rat. J. Pharmacol. Exp.
Ther. 200, 3 (1977) 479.
- 38 Kaplowitz, N., J. Kuhlenkamp: Inhibition of hepatic
metabolism of azathioprine in vivo. Gastroentero-
logy 74 (1978) 90.
- 39 Kendall-Taylor, P.: Are antithyroid drugs immuno-
suppressive? Br. Med. J. 288 (1984) 509.
- 40 LaRusso, N.F., M. Tomasz, M. Müller: In vitro inter-
action of metronidazole with nucleic acids. Gastro-
enterology 71 (1976) 917.
- 41 Law, M.P., D.G. Hirst, J.M. Brown: Enhancing effect of
misonidazole on the response of the RIF-1 tumour to
cyclophosphamide. Br. J. Cancer 44 (1981) 208.
- 42 Lee, F.Y.F., P. Workman: Modification of CCNU pharmako-
kinetics by misonidazole - A major mechanism of
chemosensitization in mice. Br. J. Cancer 47 (1983)
47.
- 43 Leonhardt, H. (Hrsg.): Histologie, Zytologie und Mikro-
anatomie des Menschen, 5. Aufl., S. 54. Thieme,
Stuttgart 1977.
- 44 Löffler, G.: Intermediärstoffwechsel V: Purine und
Pyrimidine. In: Löffler, G., P.E. Petrides, L. Weiss,
H.A. Harper (Hrsg.): Physiologische Chemie, 2. Aufl.,
469. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1979.
- 45 Malamud, D., E.M. Gonzalez, H. Chiu, R.A. Malt: Inhi-
bition of cell proliferation by azathioprine. Cancer
Res. 32 (1972) 1226.
- 46 Martin, W.M.C., N.J. McNally, J. de Ronde: Enhancement
of the effects of cytotoxic drugs by radiosensitizers.
Br. J. Cancer 43 (1981) 756.
- 47 McNally, N.J.: Enhancement of chemotherapy agents. Int.
J. Radiation Oncology Biol. Phys. 8 (1982) 593.

- 48 McNally, N.J., J. Denekamp, P.W. Sheldon, I.R. Flockhart: Hypoxic cell sensitization by misonidazole in vivo and in vitro. *Br. J. Radiol.* 51 (1978) 317.
- 49 McNally, N.J., J.de Ronde: Interaction between electron-affinic sensitizers. *Br. J. Cancer* 37, Suppl. 3 (1978) 90.
- 50 Medzihradsky, J.L., C. Klein, G.B. Elion: Differential interference by azathioprine and 6-mercaptopurine with antibody-mediated immunoregulation: Synergism of azathioprine and antibody in the control of an immune response. *J. Immunol.* 129 (1982) 145.
- 51 Millar, B.C., S. Jinks: Protection against misonidazole-induced toxicity in vitro by non-steroidal anti-inflammatory agents. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 8 (1982) 795.
- 52 Millar, B.C., S. Jinks, T.J. Powles: Flurbiprofen, a non-steroid anti-inflammatory agent, protects cells against hypoxic cell radiosensitizers in vitro. *Br. J. Cancer* 44 (1981) 733.
- 53 Miranda, P.de, L.M. Beacham III, T.H. Creagh, G.B. Elion: The metabolic fate of the methylnitroimidazole moiety of azathioprine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 3 (1973) 588.
- 54 Miranda, P.de, L.M. Beacham III, T.H. Creagh, G.B. Elion: The metabolic disposition of ^{14}C -Azathioprine in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195, 1 (1975) 50.
- 55 Mohindra, J.K., A.M. Rauth: Increased cell killing by metronidazole and nitrofurazone of hypoxic compared to aerobic mammalian cells. *Cancer Res.* 36 (1976) 36.
- 56 Moore, B.A., B. Palcic, L.D. Skarsgard: Radiosensitizing and toxic effects of the 2-nitroimidazole Ro 07-0582 in hypoxic mammalian cells. *Radiation Res.* 67 (1976) 459.
- 57 Mulcahy, R.T., D.W. Siemann, R.M. Sutherland: In vivo response of KHT sarcomas to combination chemotherapy with radiosensitizers and BCNU. *Br. J. Cancer* 43 (1981) 93.
- 58 Narayanan, V.L., W.W. Lee: Development of radiosensitizers: A medical chemistry perspective. *Adv. Pharmacol. Chemother.* 19 (1982) 155.
- 59 Neumann, H.-G.: Entstehung und Behandlung von Tumoren. In: Forth, W., D. Menschler, W. Rummel (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 3. Aufl., S. 558. Bibliographisches Institut, Mannheim-Wien-Zürich 1980.

- 60 Olive, P.L., R.E. Durand: Activation of radiosensitizers by hypoxic cells. *Br. J. Cancer* 37, Suppl. 3 (1978) 124.
- 61 Olive, P.L., D.R. McCalla: Damage to mammalian cell DNA by nitrofurans. *Cancer Res.* 35 (1975) 781.
- 62 Ozols, R.F., G.Y. Locker, J.H. Doroshow, K.R. Grotzinger, C.E. Myers, R.C. Young: Pharmacokinetics of adriamycin and tissue penetration in murine ovarian cancer. *Cancer Res.* 39 (1979) 3209.
- 63 Palcic, B., L.D. Skarsgard: Cytotoxicity of misonidazole and DNA damage in hypoxic mammalian cells. *Br. J. Cancer* 37, Suppl. 3 (1978) 54.
- 64 Petrides, P.E: Aminosäuren und Polyaminosäuren. In: Löffler, G., P.E. Petrides, L. Weiss, H.A. Harper (Hrsg.): *Physiologische Chemie*. 2. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1979.
- 65 Rajaratnam, S., G.E. Adams, I.J. Stratford, C. Clarke: Enhancement of the cytotoxicity of radiosensitizers by modest hyperthermia: The electron-affinity relationship. *Br. J. Cancer* 46 (1982) 912.
- 66 Raleigh, J.A., S.F. Lui, F.Y. Shum: Reductive activation of nitroaromatics and enzyme inhibition: Misonidazole and xanthin-oxidase. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 8 (1982) 701.
- 67 Roizin-Towle, L., E.J. Hall: Studies with bleomycin and misonidazole on aerated and hypoxic cells. *Br. J. Cancer* 37 (1978) 254.
- 68 Shenoy, M.A., J.C. Asquith, G.E. Adams, B.D. Michael, M.E. Watts: Time resolved oxygen effects in irradiated bacteria and mammalian cells - A rapid-mix study. *Radiat. Res.* 62 (1975) 498.
- 69 Shih, W.W.H., G.W. Ellison, L.W. Myers, D. Durkos-Smith, J.L. Fahey: Locus of selective depression of human natural killer cells by azathioprine. *Clin. Immunol. Immunopath.* 23 (1982) 672.
- 70 Siemann, D.W.: In vivo combination of misonidazole and the chemotherapeutic agent CCNU. *Br. J. Cancer* 43 (1981) 367.
- 71 Smith, E., I.J. Stratford, G.E. Adams: The resistance of hypoxic mammalian cells to chemotherapeutic agents. *Br. J. Cancer* 40 (1979) 316.

- 72 Smith, E., I.J. Stratford, G.E. Adams: Enhancing effect of pre-treatment of cells with misonidazole in hypoxia on their response to melphalan in air. *Br. J. Cancer* 46 (1982) 117.
- 73 Spreafico, F., M.G. Donelli, A. Bossi, A. Vecchi, S. Standen, S. Garattini: Immunodepressant activity and 6-mercaptopurine levels after administration of 6-mercaptopurine and azathioprine. *Transplantation* 16, 4 (1973) 269.
- 74 Stephens, T.C., V.D. Courtenay, J. Mills, J.H. Peacock, C.M. Rose, D. Spooner: Enhanced cell killing in lewis lung carcinoma and a human pancreatic carcinoma xenograft by the combination of cytotoxic drugs and misonidazole. *Br. J. Cancer* 43 (1981) 451.
- 75 Stone, H.B.: Enhancement of local tumour control by misonidazole and hyperthermia. *Br. J. Cancer* 37, Suppl. 3 (1978) 178.
- 76 Stratford, I.J., G.E. Adams: Effect of hyperthermia on differential cytotoxicity of a hypoxic cell radiosensitizer, Ro-07-0582, on mammalian cells in vitro. *Br. J. Cancer* 35 (1977) 307.
- 77 Stratford, I.J., P. Gray: Some factors affecting the specific toxicity of misonidazole toward hypoxic mammalian cells. *Br. J. Cancer* 37, Suppl. 3 (1978) 129.
- 78 Sutherland, R., W. MacFarlane: Cytotoxicity of radiosensitizers in multicell spheroids: Combination treatment with hyperthermia. *Br. J. Cancer* 37, Suppl. 3 (1978) 168.
- 79 Tannock, I.: Cell kinetics and chemotherapy: A critical review. *Cancer Treat. Rep.* 62 (1978) 1117.
- 80 Tannock, I.: In vivo interaction of anti-cancer drugs with misonidazole or metronidazole: Methotrexate, 5-fluorouracil and adriamycin. *Br. J. Cancer* 42 (1980) 861.
- 81 Tannock, I.: In vivo interaction of anti-cancer drugs with misonidazole or metronidazole: Cyclophosphamide and BCNU. *Br. J. Cancer* 42 (1980) 871.
- 82 Taylor, Y.C., A.M. Rauth: Differences in the toxicity and metabolism of the 2-nitroimidazole misonidazole (Ro-07-0582) in HeLa and chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 38 (1978) 2745.
- 83 Twentyman, P.R.: Modification of tumour and host response to cyclophosphamide by misonidazole and by WR 2721. *Br. J. Cancer* 43 (1981) 745.

- 84 Varghese, A.J.: Glutathione conjugates of misonidazole. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112 (1983) 1013.
- 85 Varghese, A.J., S. Gulyas, J.K. Mohindra: Hypoxia dependent reduction of 1-(2-nitro-1-imidazolyl)-3-methoxy-2-propanol by chinese hamster ovary cells and KHT tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 36 (1976) 3761.
- 86 Varghese, A.J., G.F. Whitmore: Binding to cellular macromolecules as a possible mechanism for the cytotoxicity of misonidazole. *Cancer Res.* 40 (1980) 2165.
- 87 Wardman, P., E.D. Clarke, I.R. Flockhart, R.G. Wallace: The rationale for the development of improved hypoxic cell radiosensitizers. *Br. J. Cancer* 37, Suppl. 3 (1978) 1.
- 88 Watts, M.E., R.S. Jakobs: Some examples of anomalous radiosensitizing behaviour of electron-affinic compounds in vitro. *Br. J. Cancer* 37, Suppl. 3 (1978) 80.
- 89 Weetman, A.P., M.E. Holt, A.K. Campbell, R. Hall, A.M. McGregor: Methimazole and generation of oxygen radicals by monocytes: potential role in immunosuppression. *Br. Med. J.* 288 (1984) 518.
- 90 Wellcome: Imurek^R Immunsuppressivum. Informationsbrochure.
- 91 Whitmore, G.F., S. Gulyas, A.J. Varghese: Sensitizing and toxicity properties of misonidazole and its derivatives. *Br. J. Cancer* 37, Suppl. 3 (1978) 115.
- 92 Wickramasinghe, S.N.: Effect of azathioprine on the cell cycle of haemopoietic cells. *Scand. J. Haematol.* 16 (1978) 38.
- 93 Williams, A.J.: Methimazol and generation of oxygen radicals by monocytes: potential role in immunosuppression. *Br. Med. J.* 288 (1984) 937.
- 94 Wilmanns, W.: Antimetabolite. *Internist* 12 (1971) 127.
- 95 Wilmanns, W.: Grundlagen der Immunsuppression und Immunstimulation einschließlich deren Nebenwirkungen bei immunpathologischen Erkrankungen. Sonderdruck aus: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin, 83. Band, S. 773. Bergmann, München 1977.
- 96 Workman, P., P.R. Twentyman: Structure/activity relationships for the enhancement by electron-affinic drugs of the anti-tumour effect of CCNU. *Br. J. Cancer* 46 (1982) 249.

- 97 Workman, P., P.R. Twentyman, F.Y.F. Lee, M.I. Walton:
Drug metabolism and chemosensitization. Nitroimi-
dazoles as inhibitors of drug metabolism. Biochem.
Pharmacol. 32 (1983) 857.

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H. Sauer für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die hilfreiche Betreuung und wissenschaftliche Anleitung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit danken.

Frau Reingard Herbst danke ich für die Zusammenarbeit bei den Versuchen.

LEBENS LAUF

Am 24. September 1956 wurde ich in Grafenau geboren.

1962 bis 1968 besuchte ich die Volksschule Grafenau,
1968 bis 1972 die Realschule Landshut. 1972 bis 1975
machte ich eine Ausbildung zum Bankkaufmann. 1975
bis 1978 besuchte ich die Berufsoberschule Landshut,
die ich mit dem Abitur abschloß.

1978 bis 1985 studierte ich Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München.

Im Anschluß an das Studium arbeitete ich als redaktio-
neller Mitarbeiter in einem medizinischen Fachbuchver-
lag, seit Februar 1986 bin ich als chirurgische Assisten-
tin im Kreiskrankenhaus Moosburg angestellt.

